

**PENGARUH PEMBERIAN OKSIGEN (O<sub>2</sub>) BERLEBIH  
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)  
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR  
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**PUAN NURRAHMAH**

**145130101111043**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

### **Pengaruh Pemberian Oksigen (O<sub>2</sub>) Berlebih Terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi Hepar Mencit (*Mus musculus*)**

Oleh:

**Puan Nurrahmah**  
**NIM. 145130101111043**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada tanggal 21 September 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed**  
NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**  
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Puan Nurrahmah

NIM : 145130101111043

Program Studi : Pendidikan Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi Berjudul :

Pengaruh Pemberian Oksigen (O<sub>2</sub>) berlebih terhadap Kadar MDA dan  
Gambaran Histopatologi Hepar

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaksud di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Oktober 2018

Yang Menyatakan,

(Puan Nurrahmah)

NIM. 1451301111043

**Pengaruh Pemberian Oksigen (O<sub>2</sub>) Berlebih Terhadap Kadar  
Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi  
Hepar pada Mencit (*Mus musculus*)**

**ABSTRAK**

Oksigen berfungsi dalam proses pernafasan dan memiliki peran dalam pembentukan kolagen dan perbaikan jaringan sehingga pemberian oksigen yang tepat dapat membantu dalam proses penyembuhan luka maupun dalam proses anti penuaan. Kekurangan oksigen pada suatu kondisi dapat menyebabkan kematian jaringan dan mengancam kehidupan. Terapi O<sub>2</sub> merupakan salah satu terapi pernafasan dalam mempertahankan oksigenasi, biasanya digunakan dalam penanganan kasus hipoksia jaringan. Berhasilnya terapi oksigen dipengaruhi oleh kondisi pasien dan konsentrasi oksigen yang diberikan. Konsentrasi oksigen yang aman untuk terapi oksigen mempunyai FIO<sub>2</sub> <0,5 dengan tekanan 1 ATA. Pemberian oksigen berlebih tanpa adanya perhitungan dan pengawasan dapat menyebabkan kerusakan sel, organ atau jaringan pada hepar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian oksigen berlebih terhadap kadar MDA dan gambaran histopatologi hepar pada mencit (*Mus musculus*). Penelitian kali ini dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif, kelompok perlakuan 1 diberi paparan oksigen dengan aliran FIO<sub>2</sub> 0,5 (5LPM), kelompok perlakuan 2 diberi paparan oksigen dengan aliran FIO<sub>2</sub> 0,6 (6 LPM), dan kelompok perlakuan 3 diberi paparan oksigen dengan aliran FIO<sub>2</sub> 0,7(7LPM). Penelitian ini dilakukan selama 7 hari. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit. Kadar MDA hepar mencit akan dianalisa dengan metode spektrofotometri dan histopatologi hepar menggunakan pewarnaan HE yang diamati adalah kerusakan jaringan hepar. Kadar MDA dianalisa menggunakan uji *One Way ANOVA* dan analisa data histopatologi dilakukan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian oksigen berlebih dapat meningkatkan kadar MDA secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Pemberian paparan oksigen dengan konsentrasi tertinggi FIO<sub>2</sub> 0,7 meningkatkan kadar MDA mencapai 11,2%. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu pemberian oksigen berlebih dapat meningkatkan (MDA) dan merusak gambaran histopatologi hepar berupa tampak adanya hemoragi sinusoid, kongesti vena centralis dan inflamasi jaringan hepar pada mencit (*Mus musculus*).

Kata kunci : Oksigen, Malondialdehida, Histopatologi hepar, FIO<sub>2</sub>, *Mus musculus*, ANOVA.

## The Effect of Excess Oxygen (O<sub>2</sub>) Towards Level of Malondialdehyde (MDA) and Liver Histopathology on Mice (*Mus musculus*)

### ABSTRACT

Oxygen is needed in breathing process and play a role in collagen formation along with tissues repair thus proper administration of oxygen is contribute to tissue repairment and antiaging process. Oxygen deficiency in particular conditions causing necrosis of tissues and life threatening. O<sub>2</sub> therapy is one of breathing therapy to maintenance oxygenation, usually used in management of tissues hypoxia. The successful of oxygen therapy affected by patients condition and administation of oxygen. The secure concentration of oxygen in oxygen therapy has FIO<sub>2</sub> < 0,5 with pressure of 1 ATA. Excessive administation of oxygen without any precise calculation and supervision causing damage of cell, tissue, and organ of liver. The aim of this study is to observe the effect of excessive oxygen administration towards MDA level and histopathology appearance of mice (*Mus Musculus*) liver. This study is divided to four group of treatment, consist of negatif control, first group with FIO<sub>2</sub> 0,5 (5LPM), second group with FIO<sub>2</sub> 0,6 (6LPM), and third group with FIO<sub>2</sub> 0,7 (7 LPM). this study was conducted in 7 days. Every group contain 5 mice. MDA level of mice liver is calculated with spectrophotometry and liver histopathology is observe by HE staining to examine the damaged of liver tissue. MDA levels were analyzed using test *One Way* ANOVA and data analysis conducted in histopathology descriptive. The results showed the excess oxygen administration can increase the levels of MDA significantly ( $p < 0.05$ ). The administration of oxygen exposure with the highest concentration of 0.7 FIO<sub>2</sub> increased levels of MDA to 11.2%. The conclusions of this study, the administration of excess oxygen can increase MDA level and damaging of histopathology hepar was presence of venous congestion, sinusoidal hemoragi centralis and inflammatory tissue hepar of mice (*Mus muscullus*).

**Keyword :** Oxigen, Malondialdehida, Histopatologi hepar, FIO<sub>2</sub>, *Mus muscullus*, ANOVA.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Oksigen (O<sub>2</sub>) berlebih terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi Organ Hepar.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan skripsi ini yaitu:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dosen pembimbing pertama dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) yang telah bersedia membimbing dengan penuh kesabaran, memberikan nasihat, arahan, motivasi dan tambahan pengetahuan kepada penulis.
2. drh. Analis Wisnu Wardhana, Mbiomed sebagai dosen pembimbing kedua, atas dorongan semangat, bimbingan, nasihat, kesabaran, serta tambahan ilmu yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet sebagai dosen penguji pertama, yang telah memberikan saran dan masukan untuk memperbaiki penelitian dan penulisan skripsi.
4. drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si sebagai dosen penguji kedua, yang telah memberikan saran dan masukan untuk memperbaiki penelitian dan penulisan skripsi.
5. Orang tua dr. Hj. Yosephine ayu Savitry. Sp.Kj dan Ujang Rusmana. S.H, kakak tercinta dr. Hj. Euis Maya yang selalu memberikan doa, dukungan,



semangat dan motivasi yang tiada henti untuk penulis sehingga semuanya menjadi lancar dalam penelitian dan penulisan skripsi.

6. Ramadityo. S.T my lovely jamet yang selalu membantu dan mendampingi jikalau penulis panik dengan skripsinya. Teman ku yang senantiasa membantu dengan ikhlas Iqbal S.Ab, M. Ab, Jundah S.Ab, M. Ab, Ramzi S.T, Abi S.Ab, Diah Sari S.TIP, Gesti A S.P, drh Aisyah Innayatillah, drh Aldi Nasukha, drh Waidya Wimala, drh Riera Indah, drh Ratna Anggraeni, drh Emfaty Anang, drh Nadila Dwi Ashlina, drh Riera indah, drh Davinci Oswald, drh Fitrah Aulia, dan Teman teman Fkh yang lain
7. Rekan satu tim penelitian Emfaty Anang., Ratna A., dan Merry ., yang telah bekerja dan berjuang bersama dalam penelitian ini.
8. Teman sekaligus keluarga di malang “Broden Coffee” teman teman gilaquy Alvira, Dimas, Panji, Khrisna, Kinan, Nopal, Aldi, Albi, Ibun dan Babe dll.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran yang membangun. Akhirnya semoga tugas akhir sarjana ini dapat bermanfaat

Malang, 10 Oktober 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB 1.PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah .....	4
1.4 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2.TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	6
2.2 Hati .....	7
2.2.1 Fungsi Hati .....	8
2.2.2 Histologis Hati .....	9
2.3. Malondialdehida (MDA) .....	17
2.4. Oksigen .....	18
2.5 Bahaya Paparan Oksigen .....	20
2.6 Mekanisme Toksisitas Oksigen .....	21
2.6.1 Produksi ROS Dari Respirasi Mitokondria .....	22
2.6.2 Pembentukan ROS Akibat Kerusakan Hepatosit .....	24
<b>BAB 3.KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	27
3.2 Hipotesis Penelitian .....	29
<b>BAB 4.METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	30
4.2 Populasi dan Sample .....	30
4.3. Rancangan Penelitian .....	30
4.4. Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan .....	32
4.5 Karakteristik Penelitian .....	32
4.5.1 Karakteristik Inklusi .....	32



4.5.2 Karakteristik Eksklusi .....	32
4.6 Variable Penelitian .....	32
4.7 Alat dan Bahan .....	33
4.7.1 Alat .....	33
4.7.2 Bahan.....	34
4.8 Prosedur Penelitian.....	34
4.8.1 Pembagian Kelompok Mencit.....	34
4.8.2 Aklimatisasi.....	35
4.8.3 Pemberian Oksigen Berlebih.....	35
4.8.4 Pengambilan Hepar Mencit .....	36
4.8.5 Pembuatan Preparat Histopatologi .....	36
4.8.6 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) .....	38
4.8.7 Pengamatan Histopatologi .....	39
4.8.8 Penentuan Kadar Malondialdehida .....	39
a. Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida .....	39
b. Pengukuran Kadar Malondialdehida Metode Spektrofotometri.....	40
4.9 Analisa Data .....	41
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Pengaruh Pemberian Oksigen Berlebih terhadap kadar MDA Hepar Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	42
5.2 Pengaruh Pemberian Oksigen Berlebih terhadap Gambaran Histopatologi pada Hepar Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	45
<b>BAB 6. PENUTUP</b>	
6.1 Kesimpulan .....	52
6.2 Saran .....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	53
<b>LAMPIRAN</b> .....	57

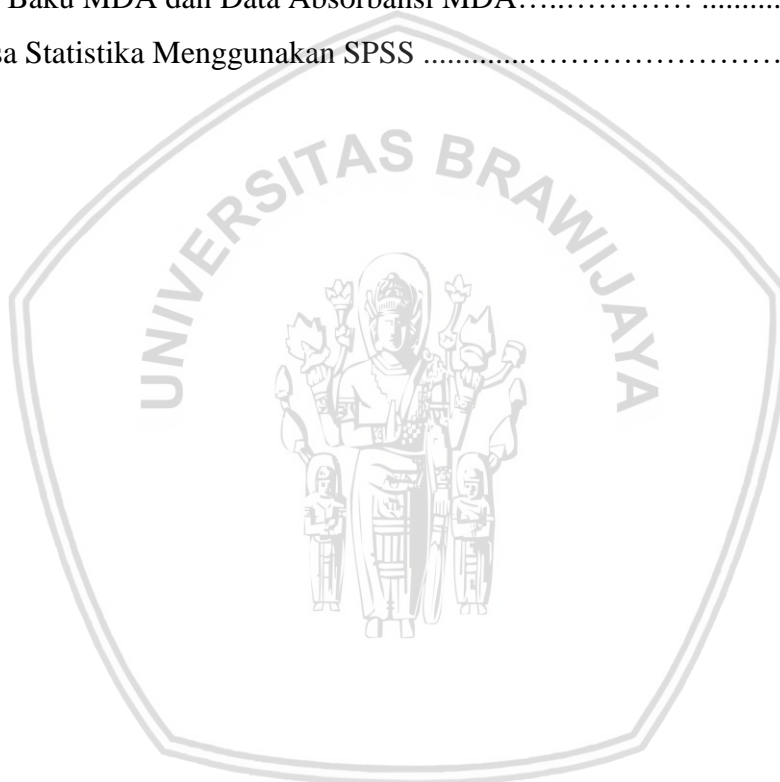
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Konversi Aliran Oksigen.....	20
4.1 Rancangan Penelitian .....	31
5.2 Rata Rata Hasil MDA Hepar .....	42



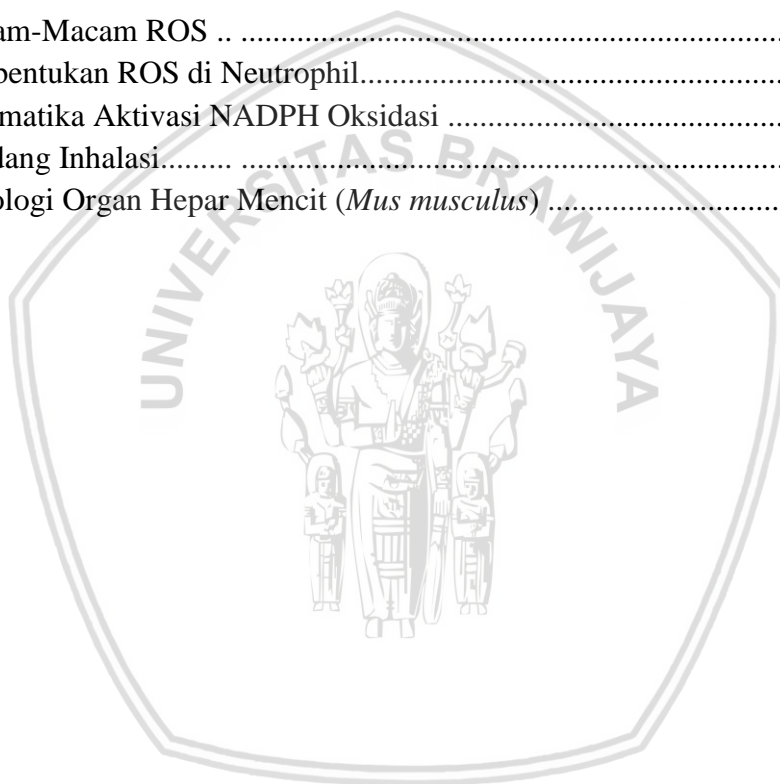
**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Keterangan Klaikan Etik. ....	46
2. Kerangka Operasional .....	47
3. Pembuatan Preparat Histopatologi.....	48
4. Penentuan Kadar Malondialdehida (MDA).....	60
5. Kurva Baku MDA dan Data Absorbansi MDA.....	62
6. Analisa Statistika Menggunakan SPSS .....	64



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Mencit .....	7
2.2 Anatomi Hepar Mencit.....	8
2.3 Histologi Stroma Hepar .....	10
2.4 Histologi Organ Hepar .....	12
2.5 Histologi Organ Hepar .....	12
2.6 Mekanisme Pembentukan MDA .....	17
2.7 Macam-Macam ROS .. ..	19
2.8 Pembentukan ROS di Neutrophil.....	23
2.9 Sistematisasi Aktivasi NADPH Oksidasi .....	25
4.1 Kandang Inhalasi.....	36
5.2 Histologi Organ Hepar Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	45



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persentase
°C	Derajat Celcius
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenbin Trifosfat
BNJ	Beda Nyata Jujur
FIO <sub>2</sub>	Farcion Of O <sub>2</sub> Inspired
g	Gram
HClO	Hypochlorous acid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogen Peroksida
HE	<i>Hematoxylin Eosin</i>
LPM	Liter Per Menit
m <sup>2</sup>	Meter kubik
MDA	Malondialdehida
mm	Milimeter
Na-Thio	<i>Natrium Thiosulfat</i>
O <sub>2</sub>	Oksigen
OH <sup>-</sup>	Hidroksil Ion
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoksida anion
PBSA	Phosphat Buffer Saline Azida
PFA	Paraformaldehyda
PUFA	<i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RE	Retikulum Edoplasma
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	Superoxida Dismutase
TBA	Thiobarbituric Acid

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Oksigen merupakan unsur vital dalam proses metabolisme seluruh sel tubuh. Oksigen dalam kadar normal berfungsi menjadi komponen dalam pembentukan Adenin trifosfat (ATP) di mitokondria sel, selain berguna dalam proses pernafasan dan metabolisme, oksigen juga memiliki peran dalam pembentukan kolagen dan perbaikan jaringan sehingga pemberian oksigen yang tepat dapat membantu dalam proses penyembuhan luka maupun dalam proses anti penuaan (Asali, 2010). Tubuh kehilangan asupan oksigen dalam jangka waktu tertentu maka sel tubuh akan mengalami kerusakan bahkan dapat menyebabkan kematian.

Oksigen selain untuk pernafasan juga digunakan sebagai terapi suatu penyakit. Pemberian terapi O<sub>2</sub> bertujuan mengatasi keadaan hipoksemia, menurunkan kerja pernafasan, menurunkan beban kerja otot jantung (miokard). Indikasi pemberian terapi O<sub>2</sub> adalah kerusakan O<sub>2</sub> jaringan yang diikuti gangguan metabolisme dan sebagai bentuk hipoksemia. Oksigen bertekanan tinggi yang digunakan sebagai terapi sudah lama dilakukan. Salah satunya yaitu terapi oksigen hiperbarik pada kasus hipoksia merupakan terapi medis dimana pasien diberikan 100 % oksigen pada tekanan yang lebih tinggi dari tekanan atmosfer untuk bernafas. Di dunia veteriner sendiri terapi menggunakan oksigen juga mulai diterapkan pada tahun 1887 dimana dilakukan penelitian di Valenzuela mengenai efek dari terapi oksigen hiperbarik pada kelinci (Edward, 2010). Kemudian pada tahun 1942, dimana End dan Long menggunakan HBO (*Hyperbaric Oxygen*) untuk menangani kasus keracunan karbon monoksida pada hewan coba yang kemudian diikuti dengan



penanganan berbagai penyakit seperti penyakit akibat trauma maupun iskemik (Jain, 2017). Terapi oksigen hiperbarik digunakan untuk terapi penyakit seperti inflamasi.

Terapi oksigen dapat memberikan manfaat apabila digunakan secara tepat dan membahayakan jika digunakan secara tidak tepat (Ali et al., 2014; Sourabh et al., 2012). Kurangnya pengawasan ataupun adanya kelalaian petugas terhadap pemberian terapi seperti ini dengan memberikan paparan oksigen berlebih dapat menimbulkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang biasa disebut dengan radikal bebas. Lama paparan, tekanan atmosfer dan *Fraction of O<sub>2</sub> Inspired* (FIO<sub>2</sub>) akan menentukan dosis oksigen yang dapat menyebabkan toksik bagi tubuh. *Fraction of O<sub>2</sub> Inspired* (FIO<sub>2</sub>) yaitu konsentrasi oksigen yang terhirup adalah 0,21 pada keadaan normal (Lane, 2002). Penelitian Antoine Lavoisier pada tahun 1783 mengenai paparan O<sub>2</sub> dengan konsentrasi FIO<sub>2</sub> sebesar 1,0 akan menyebabkan kematian pada marmut. Paparan oksigen selama beberapa hari dengan konsentrasi FIO<sub>2</sub> > 0,8 dapat menyebabkan kematian pada hewan (Kallet et al., 2013). Radikal bebas seperti *hydrogen peroxide* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), *superoxide anion* (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), *hydroxyl radical* (OH) dan *hydroxyl ion* (OH<sup>-</sup>) yang dapat menyebabkan kerusakan pada hati (Jeong et al. 2006; McElwee et al. 2009).

ROS bisa menyebabkan gangguan hati setelah produksinya menguasai pertahanan antioksidan. Peningkatan kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> telah ditemukan sebagai faktor utama yang menyebabkan gangguan hati seperti penyakit hati alkoholik, steatohepatitis non-alkohol, hepatitis virus dan hemochromatosis (Cesaratto et al.,

2004). Starke dan Farber pada tahun (1985) telah mempelajari mekanisme hidrogen peroksida dan membunuh sel hepatosit tikus berbudaya primer beberapa jam sampai satu hari dengan durasi kultur (Jaeschke, 2011). Menurut penelitian Ben dkk, yang melakukan uji histopatologi setelah paparan radikal bebas pada hepar serta ginjal dimana efek merusak dari stres oksidatif dihadapang oleh mekanisme pertahanan natural melalui enzim oksidatif, ditunjukkan dengan peningkatan kadar SOD pada hepar. Hepar tampak nekrosis, infiltrasi sel leukosit dan vakuolisasi hepatosit, ditandai dengan peningkatan biomarker toksisitas hepar, yakni AST dan ALT (Ben dkk, 2017). Penelitian lain oleh Nuno dkk pada tahun 2012, yang meneliti gambaran histologi yang diinduksi oleh N-Diethylnitrosamine sehingga menghasilkan radikal bebas pada hepar, menunjukkan adanya perubahan pada histologi, diantaranya mitosis, hiperplasia, perubahan inti sel, area yang nekrosis serta apoptosis (Nuno dkk, 2012). Sel yang rusak yang disebabkan karena adanya peningkatan radikal bebas dapat menstimulasi proses peroksidasi lipid dan mengakibatkan stres oksidatif yang dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter yaitu malondialdehida (MDA) (Valko *et al.*, 2006). Berdasarkan latar belakang di atas, perlu adanya penelitian tentang pengaruh pemberian oksigen berlebih terhadap kadar malondialdehida (MDA) dan gambaran histopatologi hepar pada mencit (*Mus Musukulus*). Oksigen yang diberikan dengan dosis masing masing 5 lpm, 6 lpm, dan 7 lpm.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah pemberian oksigen berlebih dapat mempengaruhi kadar malondialdehida (MDA) hepar pada mencit (*Mus musculus*)?
2. Apakah pemberian oksigen berlebih dapat mempengaruhi gambaran histopatologi hepar pada mencit (*Mus musculus*)?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain balb/C dengan umur 8-12 minggu. Berat badan mencit antara 20-30 gram. Hewan coba yang digunakan sudah mendapatkan layak etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP UB) dengan No: 891-KEP-UB.
2. Oksigen (O<sub>2</sub>) berkadar 100% yang didapat dari CV. CBS berbentuk gas dan tidak berwarna. Oksigen digunakan sebagai paparan perlakuan 1,2 dan 3.
3. Oksigen (O<sub>2</sub>) yang diberikan aliran masing-masing FIO<sub>2</sub> 0,5, 0,6 dan 0,7 yang dikonversikan menjadi 5 lpm, 6 lpm, dan 7 lpm selama 12 jam perhari 7 hari yang berasal dari tangki oksigen 100% dan diberikan melalui kandang modifikasi.
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar Malondialdehida (MDA) hepar yang diukur dengan spektrofotometer dan gambaran histopatologi hepar.

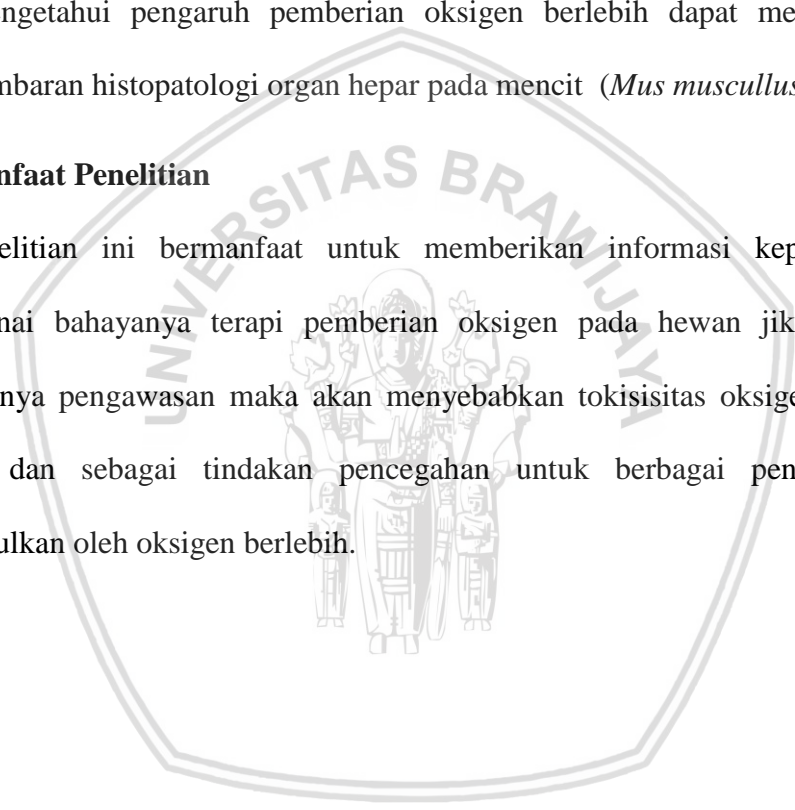
#### 1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh pemberian oksigen berlebih dapat mempengaruhi kadar Malondialdehida (MDA) hepar pada mencit (*Mus musculus*).
2. Mengetahui pengaruh pemberian oksigen berlebih dapat mempengaruhi gambaran histopatologi organ hepar pada mencit (*Mus musculus*).

#### 1.5 Manfaat Penelitian

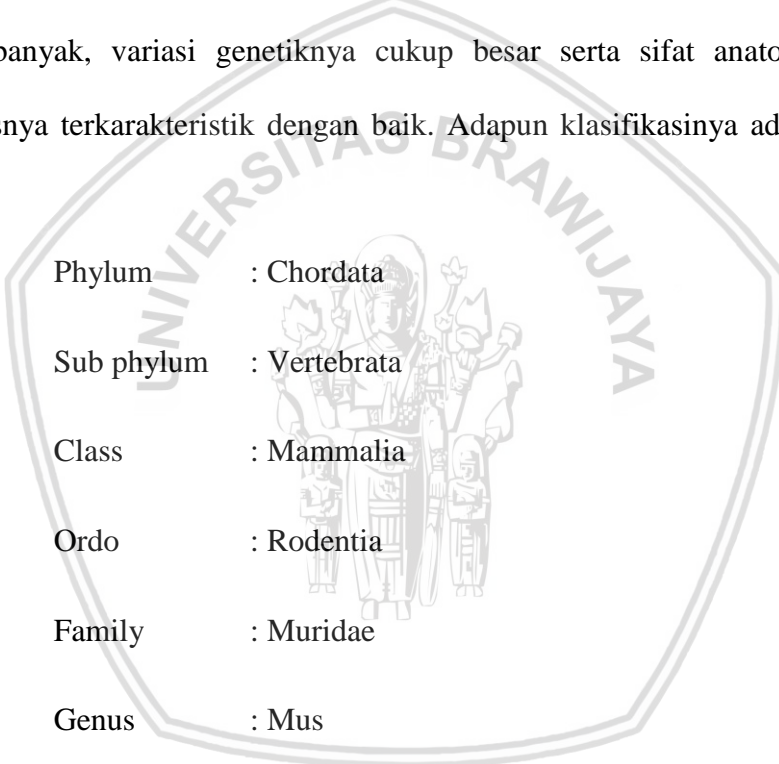
Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi kepada klinisi mengenai bahayanya terapi pemberian oksigen pada hewan jika diberikan kurangnya pengawasan maka akan menyebabkan toksisitas oksigen di dalam tubuh dan sebagai tindakan pencegahan untuk berbagai penyakit yang ditimbulkan oleh oksigen berlebih.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 1.1 Mencit (*Mus musculus*)

Hewan coba atau hewan laboratorium merupakan hewan yang sengaja dipelihara dan ditenakkan untuk dipakai sebagai hewan model. Hewan percobaan yang dipakai pada penelitian ini adalah mencit. Mencit (*Mus musculus*) termasuk mamalia pengerat (rodensia) yang cepat berkembang biak, mudah dipelihara dalam jumlah banyak, variasi genetiknya cukup besar serta sifat anatomisnya dan fisiologisnya terkarakteristik dengan baik. Adapun klasifikasinya adalah sebagai berikut :



Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Mus
Species	: <i>Mus musculus</i>

Mencit (*Mus musculus*) memiliki ciri-ciri berupa bentuk tubuh kecil, berwarna putih. Kondisi ruang untuk pemeliharaan mencit (*Mus musculus*) harus bersih, kering dan jauh dari kebisingan. Suhu ruang pemeliharaan juga harus dijaga kisarannya antara 25-27°C serta kelembaban udara antara 40-60%. Mencit jantan dewasa dengan umur 8-12 minggu memiliki berat badan 20-30 g. Lama hidupnya 1-2 tahun, dapat mencapai 3 tahun. Mencit jantan sering digunakan dalam

penelitian dengan pertimbangan hewan tersebut memiliki beberapa keuntungan yaitu siklus hormon relatif stabil (Soewolo, 2010).

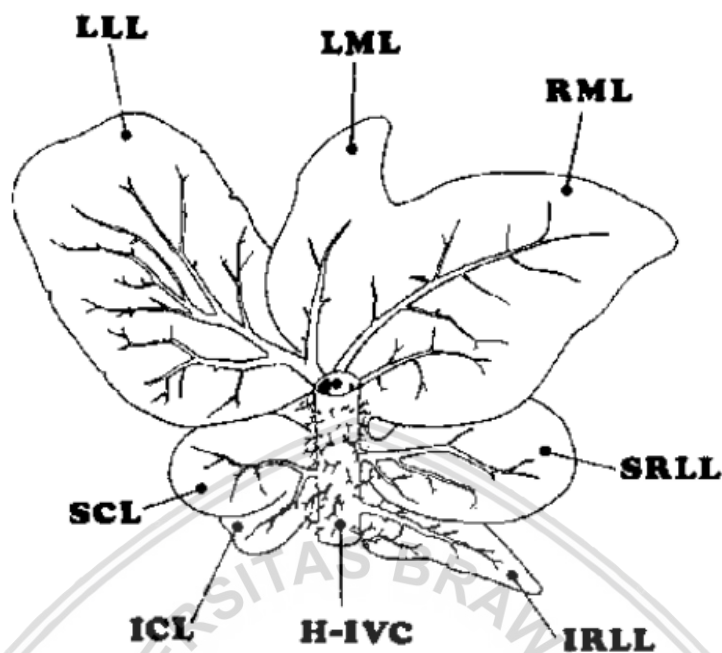


**Gambar 2.1** Mencit (*Mus musculus*) (Akbar, 2010)

## 1.2 Hati (Hepar)

Hati merupakan organ metabolisme terpenting dalam proses sintesis, penyimpanan, dan metabolisme. Hepar terletak dalam rongga perut dengan permukaan atasnya cembung melekat pada diafragma, sedangkan bagian bawahnya cekung bersentuhan dengan lambung dan duodenum. Hepar dibungkus oleh jaringan ikat yang disebut dengan kapsula glissoni. Kapsula glissoni terdiri dari empat lobus yaitu lobus kanan, lobus kiri, lobus kaudatus dan lobus kuadratus (**Gambar 2.2**). Lobus kanan merupakan lobus terbesar, organ ini diikat oleh ligamentum falsiform yaitu memisahkan antara lobus kanan dan lobus kiri (Robbins dan Cotran, 2010). Lobulus lobulus yang terdiri atas triad portal dan vena centralis.





**Gambar 2.2 :** Anatomi hepar mencit. H-IVC intrahepatic inferior vena cava; ICL: Inferior lobus caudal; SCL; superior lobus caudal; LLL: lateral lobus sinister; RML: lobus median dexter; SRL: lobus lateralis sinister superior; IRL: lobus inferior lateralis sinister (Lorente *et al.*, 1995).

### 1.2.1 Fungsi Hati

Menurut Guyton dan Hall (2008), hati mempunyai beberapa fungsi yaitu:

#### a. Metabolisme karbohidrat

Fungsi hati dalam metabolisme karbohidrat adalah menyimpan glikogen dalam jumlah besar, mengkonversi galaktosa dan fruktosa menjadi glukosa, glukoneogenesis, dan membentuk banyak senyawa kimia yang penting dari hasil perantara metabolisme karbohidrat.

#### b. Metabolisme lemak

Fungsi hati yang berkaitan dengan metabolisme lemak, antara lain: mengoksidasi asam lemak untuk menyuplai energi bagi fungsi tubuh yang lain,

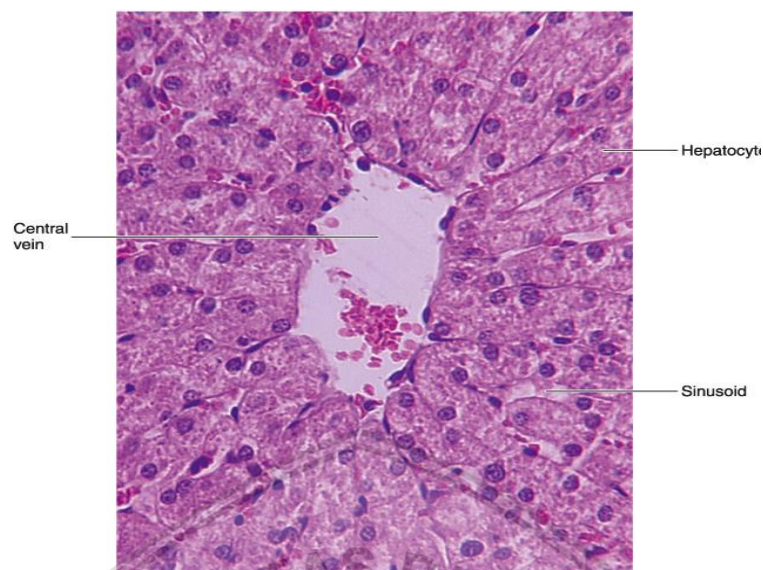
membentuk sebagian besar kolesterol, fosfolipid dan lipoprotein, membentuk lemak dari protein dan karbohidrat.

#### c. Metabolisme protein

Fungsi hati dalam metabolisme protein adalah deaminasi asam amino, pembentukan ureum untuk mengeluarkan amonia dari cairan tubuh, pembentukan protein plasma, dan interkonversi beragam asam amino dan membentuk senyawa lain dari asam amino. Hati juga merupakan tempat penyimpanan vitamin, hati sebagai tempat menyimpan besi dalam bentuk feritin, hati membentuk zat-zat yang digunakan untuk koagulasi darah dalam jumlah banyak dan hati mengeluarkan atau mengekskresikan obat-obatan, hormon dan zat lain.

#### 1.2.2 Histologis hati

Hati dibungkus oleh suatu simpai tipis jaringan ikat yang menebal di hilus, tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki organ dan keluarnya duktus hepatica kiri dan kanan serta pembuluh limfe dari hati. Pembuluh-pembuluh dan duktus ini dikelilingi jaringan ikat di sepanjang perjalanannya ke bagian ujung (atau bagian asal) di dalam celah portal di antara lobulus hati. Di stroma ini, jalinan serat retikular halus mengelilingi dan menopang sel hati dan sel endotel sinusoid di lobulus hati (Janquera, 2005).



**Gambar 2.3 :** Histologi stroma hepar (Janquera, 2005)

Sel sel hati atau hepatosit merupakan sel epitel yang berkelompok membentuk lempeng yang saling berhubungan. Hepatosit tersusun berupa ribuan lobulus hati kecil polihedral yang merupakan unit fungsional dan struktural hati. Setiap lobulus memiliki tiga sampai enam area portal di bagian perifernya dan suatu venula yang disebut vena sentral di bagian pusatnya (Janquera, 2005)

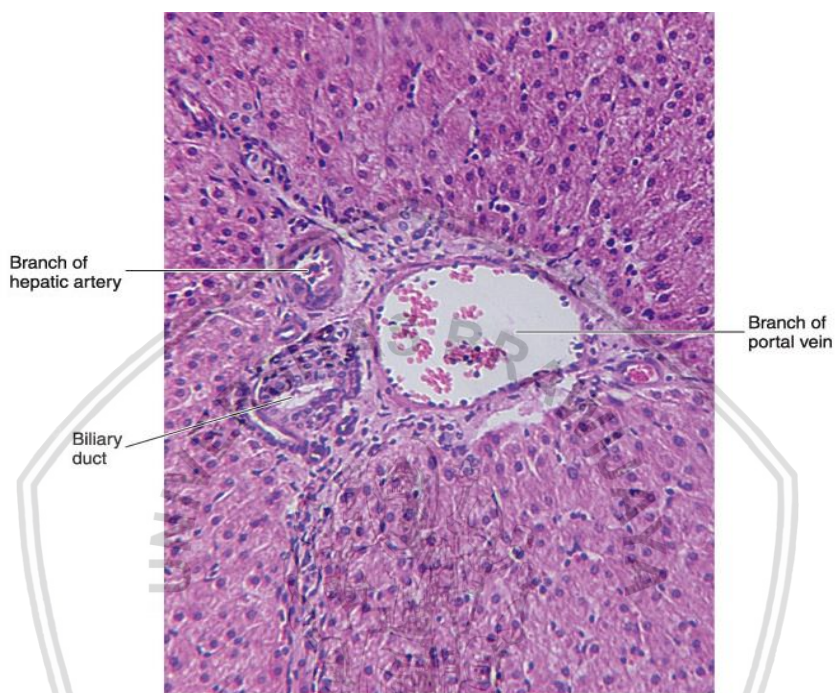
Zona portal di sudut lobulus terdiri atas jaringan ikat dengan suatu venula (cabang vena portal), arteriol (cabang arteri hepaitka dan duktus epitel kuboid (cabang sistem kubus biliaris), ketiga struktur yang disebut trias porta. Venula tersebut mengandung darah dari vena mesentrikasuperior dan inferior serta vena lienalis. Arteriol menerima darah dari truncus coeliacus dari aorta abdominalis. Duktusnya membawa empedu yang dibuat oleh sel sel parenkim (hepatosit) dan akhirnya mencurahkan isinya ke dalam duktus hepaticus. Area portal juga memiliki serabut saraf dan pembuluh limfe, pada beberapa hewan (misalnya babi), setiap

lobulus terpisah dari lobulus lain oleh selapis jaringan ikat sehingga lobulus dapat dikenali dengan jelas (Janquera, 2005).

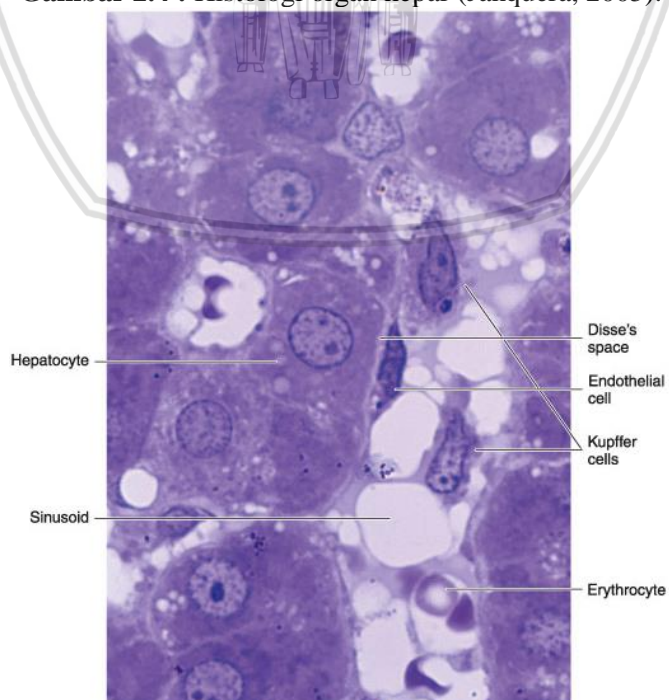
Hepatosit membentuk suatu lempeng yang berhubungan seperti susunan batu bata dan lempeng sel ini tersusun radial disekeliling vena sentral. Mulai dari bagian perifer lobulus ke pusatnya, lempeng hepatosit bercabang dan beranastomosis secara bebas membentuk struktur yang menyerupai spons. Celah diantara lempeng ini mengandung komponen mikrovaskuler penting, yaitu sinusoid hati. Sinusoid lebar yang tidak teratur ini hanya terdiri atas lapisan diskontinu sel endotel. Sel sel endotel terpisah dari hepatosit di bawahnya oleh suatu lamina basal tipis yang tidak kontiniu dan suatu celah perisinusoid (celah Disse) yang sangat sempit. Mikrovili hepatosit menonjol ke dalam celah tersebut demi terjaidnya pertukaran antara sel tersebut dan plasma. Pertukaran ini penting secara fisiologis bukan saja karena banyaknya makromolekul (misalnya lipoprotein, albumin, fibrinogen) yang disekresi ke dalam darah oleh hepatosit, namun juga karena hati mengambil dan mengatabolisme sejumlah besar molekul besar ini. Sinusoid diselubungi serat retikular halus. Selain sel endotel, terdapat dua sel penting yang berhubungan dengan sinusoid tersebut yaitu sel kupffer yang ditemukan diantara sel endotel sinusoid dan permukaan luminal didalam sinusoid, terutama dekat area portalnya. Fungsi utamanya yaitu menghancurkan eritrosit tua, menggunakan ulang heme, menghancurkan bakteri atau debris yang dapat memasuki darah portal dari usus, dan bekerja sebagai sel penyaji antigen pada imunitas adaptif. Kemudian di celah perisinusoid terdapat sel penimbun lemak stelata (atau sel sel ito) dengan droplet lipid kecil yang mengandung vitamin A. Sel sel tersebut, yang membentuk sekitar



8% sel di hati tetapi sulit ditemukan pada sediaan rutin, menyimpan banyak vitamin A tubuh, menghasilkan komponen matriks ekstraseluler, dan ikut berperan mengatur imunitas setempat (Janquera, 2005).



**Gambar 2.4 :** Histologi organ hepar (Janquera, 2005).



**Gambar 2.5 :** Histologi organ hepar (Janquera, 2005).

Hati menerima sebagian besar darah dari vena porta, yang membawa darah sedikit oksigen tetapi kaya nutrisi dari organ visera abdominal. Darah teroksigenasi dalam jumlah lebih sedikit berasal dari arteri hepatis. Sistem porta membawa dari pankreas, limpa dan usus. Nutrient terakumulasi dan diubah dalam hati, dan zat toksik dinetralkan dan dihilangkan di tempat tersebut. Hati memiliki vena porta bercabang-cabang dan menjadi vena porta kecil menuju celah portal. Vena portal bercabang menjadi vena pendistribusi kecil yang berjalan di tepi setiap lobulus dan berujung ke dalam sinusoid. Sinusoid berjalan radial, berkonvergensi di pusat lobulus untuk membentuk vena sentralis atau vena sentrobular. Pembuluh ini, seperti sinusoid, berdinding tipis, dan hanya terdiri atas sel-sel endotel yang ditunjang sedikit serat kolagen. Vena sentralis dari setiap lobulus menyatu menjadi vena, yang akhirnya membentuk dua atau lebih vena hepatis besar yang bermuara ke vena cava inferior (Janquera, 2005)

Arteri hepatis bercabang berulang kali dan membentuk arteriol di area portal dan beberapa diantaranya berakhir langsung ke dalam sinusoid pada jarak-jarak tertentu dari celah portal sehingga darah yang kaya oksigen ditambahkan ke darah vena portal di sinusoid. Darah selalu dari tepi ke pusat lobulus hati, akibatnya oksigen dan metabolit serta substansi toksik maupun non-toksik lain yang diserap dalam usus sampai di sel-sel bagian tepi lebih dulu dan kemudian baru tiba di sel-sel bagian pusat lobulus. Arah aliran darah ini menjelaskan mengapa sifat dan fungsi hepatosit periportal berbeda dari sel-sel sentrolobular. Hepatosit didekat area portal dapat bergantung pada metabolisme aerob yang sering lebih aktif berperan pada sintesis protein, sedangkan sel yang berada lebih ke pusat terpajan nutrient



dan oksigen dengan konsentrasi rendah serta lebih berperan pada detoksifikasi dan metabolisme glikogen (Janquera, 2005)

Hepatosit merupakan sel polihedral besar dengan enam atau lebih permukaan, dan berdiameter 20-30  $\mu\text{m}$ , pada sediaan yang dipulas dengan hematoxilin dan eosin (HE), sitoplasma hepatosit biasanya bersifat eosinofilik karena banyaknya mitokondria, yang berjumlah hingga 2000 per sel. Hepatosit memiliki inti sferis besar dengan nukleolus. Sel-sel tersebut sering memiliki dua atau lebih nukleolus dan sekitar 50% darinya bersifat poliploid, dengan dua, empat, delapan atau melebihi jumlah kromosom diploid normal. Inti poliploid ditandai dengan ukuran yang lebih besar, yang proporsional dengan sifat ploidy. Permukaan setiap hepatosit berkontak dengan dinding sinusoid, melalui celah *disse*, dan dengan permukaan hepatosit berkontak, terbentuk suatu celah tubular diantara kedua sel ini yang disebut kanalikuli biliaris (Janquera, 2005)

Kanalikuli, bagian pertama sistem duktus biliaris, adalah celah panjang berdiameter 1-2  $\mu\text{m}$ . Kanalikuli hanya dibatasi membran plasma dari dua hepatosit, yang menjulurkan sedikit mikrovili dibagian dalamnya. Membran sel didekat kanalikuli ini diikat dengan kuat oleh taut erat. Taut celah juga terdapat diantara hepatosit, yang memungkinkan tempat komunikasi antar sel dan koordinasi aktivitas sel-sel. Kanalikuli biliaris membentuk suatu jalinan anastomosis kompleks di sepanjang lempeng lobulus hati dan berakhir di daerah portal. Sehingga, aliran empedu berlangsung dalam arah yang berlawanan dengan arah aliran darah, yaitu dari pusat lobulus ke bagian tepi, di area portal perihedral kanalikulus biliaris bermuara ke dalam duktulus biliaris yang tersusun dari sel-sel kuboid yang disebut

kolangiosit. Setelah melalui jarak yang pendek, duktus melewati hepatosit pembatas di lobulus dan berakhir dalam duktus biliaris di celah portal. Duktus biliaris dilapisi epitel kuboid atau silindris dan mempunyai selubung jaringan ikat khusus. Duktus-duktus ini secara berangsur membesar, menyatu, dan membentuk duktus hepaticus kiri dan kanan, yang akhirnya keluar dari hati (Janquera, 2005)

Hepatosit memiliki banyak retikulum endoplasma baik kasar maupun halus. Retikulum endoplasma kasar untuk sintesis plasma menimbulkan sifat basofilia sitoplasma, yang sering lebih jelas di hepatosit dekat area portal. Berbagai proses penting terjadi dalam RE halus, yang terdistribusi difus di seluruh sitoplasma. Organel ini bertanggung jawab atas proses oksidasi, metilasi, dan konjugasi yang diperlakukan untuk menginaktifkan atau mendetoksifikasi berbagai zat sebelum dieskresi. RE halus merupakan suatu sistem labil yang segera bereaksi terhadap molekul yang diterima hepatosit (Janquera, 2005)

Hepatosit sering mengandung tumpukan glikogen, yang tampak secara ultrastruktural sebagai granul padat elektron yang kasar dan sering berkumpul dalam sitosol dekat dengan RE halus. Glikogen hati merupakan timbunan glikosa dan dimobilisasi jika kadar glukosa darah menurun di bawah normal. Dengan cara ini, hepatosit mempertahankan kestabilan kadar glukosa darah, yakni salah satu sumber energi utama tubuh. Hepatosit juga biasanya menyimpan trigliserida berupa droplet lipid kecil. Kapasitas untuk menyimpan metabolit tersebut penting karena hal tersebut menyuplai energi bagi tubuh diantara waktu-waktu makan. Hepatosit biasanya tidak menyimpan protein dalam granula sekterorik tetapi secara kontiniu

melepaskannya dalam aliran darah. Sekitar 5% protein diekspor oleh hati dihasilkan oleh makrofag stelata sinusoid (Janquera, 2005).

Hepatosit bertanggung jawab atas konversi lipid dan asam amino menjadi glukosa melalui suatu proses enzimatik kompleks yang disebut glukogenesis. Hepatosit juga merupakan tempat utama deaminasi asam amino yang menimbulkan produksi urea yang diangkut dalam aliran darah ke ginjal dan dieksresikan dalam tempat tersebut. Lisosom hepatosit sangat penting untuk pergantian dan degradasi organel intrasel. Peroxisom juga banyak dijumpai dan penting untuk oksidasi kelebihan lemak asam lemak, penguraian hidrogen peroksida yang dibentuk oksidasi tersebut (melalui aktivitas katalase), pemecahan kelebihan purin menjadi asam urat, dan berpartisipasi dalam sintesis kolesterol, asam empedu dan sejumlah lipid yang digunakan neuron untuk membentuk mielin. Setiap hepatosit dapat memiliki hingga 50 kompleks Golgi yang terlibat dalam pembentukan lisosom dan sekresi protein, glikoprotein, dan lipoprotein dalam plasma (Janquera, 2005)

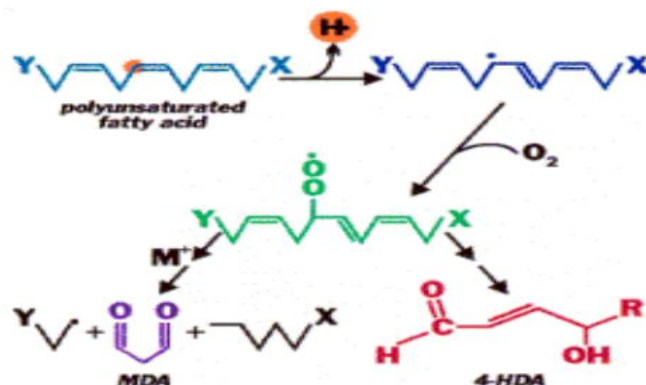
Salah satu yang dapat diamati pada histologi organ hepar yaitu kerusakan jaringan atau sel hepar seperti contoh adanya hemoragi yaitu eritrosit yang keluar dari bagian tertentu dari sistem sirkulasi yang mengalami jejas atau luka ke jaringan, dalam rongga tubuh atau keluar tubuh. Gambaran mikroskopis hemoragi adalah darah tampak ke luar dari pembuluh darah, masuk ke dalam jaringan interstisial/ antar sel pada beberapa organ. Contoh selanjutnya yaitu adanya inflamasi. Inflamasi merupakan respon biologis jaringan pembuluh darah terhadap rangsangan berbahaya, seperti agen patogen, sel mati atau rusak. Sel radang yang dikeluarkan pada saat terjadi fase inflamasi yaitu trombosit, sel plasma, fibroblas, (*Antigent*

*Presenting Cells*) APC, giant sel dan sel darah putih. Sel darah putih diklasifikasi berdasarkan bentuk inti yaitu granulosit terdiri dari neutrofil, eosinofil, basofil dan agranulosit limfosit dan monosit (Arimbi dkk, 2015).

### 1.3 Malondialdehid (MDA)

*Malondialdehyd* (MDA) merupakan suatu produk akhir peroksidasi lipid, digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid dan dapat menggambarkan derajat stres oksidatif. *Malondialdehyde* (MDA) dapat terbentuk apabila radikal bebas hidroksil seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) bereaksi dengan komponen asam lemak dari membran sel sehingga terjadi reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lemak. *Malondialdehyd* (MDA) juga terbentuk dari peroksidasi lipid (lipid peroxidation) pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksi) dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA).

Hydrogen peroksida tersebut merupakan ROS dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehyd yang bersifat toksik terhadap sel dan berbeda panjang rantainya, antara lain MDA, yang merupakan salah satu aldehyd utama yang terbentuk. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan mengukur produk akhirnya, yaitu malondialdehyde (MDA), yang merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh dan yang bersifat toksik terhadap sel. Pengukuran kadar MDA merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stres oksidatif (Mudassir dkk, 2012).



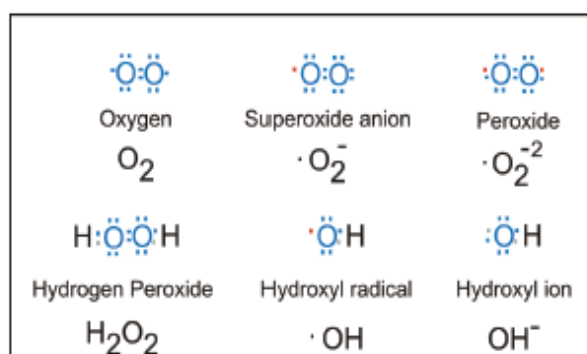
Gambar 2.6 Mekanisme pembentukan MDA (Mudassir dkk, 2012)

#### 1.4 Oksigen

Oksigen adalah unsur kimia dalam sistem table periodik yang mempunyai lambang O dan nomor atom 8, merupakan unsur golongan kalkogen dan dapat dengan mudah bereaksi dengan hampir semua unsur lainnya (utamanya menjadi oksida). Pada temperatur dan tekanan standar, dua atom unsur ini berikatan menjadi dioksigen, yaitu senyawa gas diatomik dengan rumus  $O_2$  yang tidak berwarna, tidak berasa, dan tidak berbau. Oksigen berfungsi dalam proses pernafasan dan memiliki peran dalam pembentukan kolagen dan perbaikan jaringan sehingga pemberian oksigen yang tepat dapat membantu dalam proses penyembuhan luka maupun dalam proses anti penuaan (Asali, 2010). Oksigen juga dibutuhkan oleh mitokondria untuk pembentukan ATP juga untuk terapi suatu penyakit. Terapi hiperbarik oksigen yaitu pemberian oksigen lebih tinggi dari tekanan atmosfer yang biasa digunakan pada pasien keracunan karbon monoksida, penyakit dekompresi, infeksi luka bakar superficial, jika terapi hiperbarik digunakan dalam durasi yang lama terkadang dalam jangka pendek dapat menyebabkan toksisitas oksigen. (Held, 2015)

Toksisitas oksigen yaitu dengan terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas diproduksi sebagai hasil dari proses oksireduktif pada mitokondria dan juga produksi dari aksi enzim seperti xanthin atau urate oksidase sebagai sumber ekstra mitokondria, dari reaksi autooksidasi, dan dari fagositosis selama proses kliren bakteri. Radikal bebas ini sebabkan peroksidasi lipid, terutama di membran sel, yang menghambat asam nukleat dan sintesis protein, dan inaktivasi enzim selular, normalnya beberapa enzim antioksidan seperti glutathion peroksidase, katalase, dan superoksida dismutase melindungi tubuh dari banyak radikal bebas ini, tapi pada kondisi hiperoksida, banyaknya produksi radikal bebas yang dihasilkan membuat sistem enzim lemah dan akhirnya banyak radikal bebas yang tidak diinaktivasi.

Awalnya, ROS terbentuk ketika oksigen atomik memiliki dua elektron tak berpasangan yang terpisah orbitnya dari kerangka elektron. Struktur elektron ini membuat oksigen cenderung membuat suspek oksigen yang radikal. Reduksi oksigen yang logis melalui penambahan elektron mengarah pada banyak oksigen yang radikal diantaranya: superoxide, hidrogen peroksida, hydroxyl radical, dan nitrit oksida (Jones *et al.*, 2000) Lihat gambar 2.7



**Gambar 2.7 :** macam-macam elektron ROS (Held, 2015)



Sumber utama produksi ROS dalam sel adalah mitokondria karena sekitar 80%-90%  $O_2$  yang masuk 10 digunakan oleh mitokondria untuk membentuk ROS sebagai hasil sampingan (Wu dan Cederbaum, 2003). Secara fisiologis, radikal bebas berperan dalam proses transpor elektron, metabolisme tubuh dalam keadaan aerobik, fagositosis, serta sintesis DNA dan protein.

### 1.5 Bahaya Paparan Oksigen Berlebih

Menurut penelitian (Manson, 2005) bahwa paparan oksigen menyebabkan toksik pada  $FIO_2$  tinggi ( $>0,50$ ) selama  $\geq 24$  jam pada tekanan normal (1 ATA). Paparan selama 12 jam menyebabkan kongesti, edema pulmo dan atelectasis. Tekanan oksigen yang tinggi yaitu 1,6-4 ATA dan  $FIO_2$  tinggi pada waktu yang cepat juga dapat menyebabkan efek toksik. Penelitian James Lorrain Smith dalam *Kallet et al* (2013) yaitu pemberian paparan oksigen dengan  $FIO_2$  0,4 pada mencit selama satu minggu tidak menunjukkan adanya keracunan oksigen.

Paparan oksigen dengan  $FIO_2$  0,7 menghasilkan kondisi berbeda pada hewan yang berbeda. Kelinci dapat bernafas pada  $FIO_2$  0,6 selama tiga bulan tanpa menunjukkan adanya keracunan oksigen, pada paparan  $FIO_2$  0,7 menunjukkan hasil seperti kegagalan bernafas akut dan mati. Kematian pada hewan dipengaruhi oleh jenis hewan, spesies, umur dan strain hewan tersebut (*Kallet et al.*, 2013). Pemberian paparan  $FIO_2$  0,7 sampai 0,8 pada mencit mengalami kegagalan respirasi hingga kematian (*Mach et al.*, 2011). Paparan oksigen dengan  $FIO_2$  0,75-0,90 menghasilkan lesi yang hampir sama dengan paparan  $FIO_2$  0.95-1.0 (*Kallet et al.*, 2013). Tinggi rendahnya tingkat  $FiO_2$  dipengaruhi oleh alat yang digunakan, dalam

penelitian ini alat yang digunakan mencerminkan konsep masker be-reservoir. Konversi aliran oksigen dengan tingkat FIO<sub>2</sub> dapat ditinjau di tabel 2.1.

**Tabel 2.1** Konversi aliran oksigen dengan konsentrasi oksigen (OBHG, 2010)

ESTIMATED NON-REBREATHER FLOW RATES*	
Flow Rate (100% O <sub>2</sub> /L)	% Oxygen Concentration
6	60%
7	70%
8	80%
9	90%
10	95+%

\* Assuming normal ventilatory pattern

Konsentrasi oksigen yang tinggi dapat mengakibatkan peningkatan produksi ROS yang akan mengakibatkan kerusakan pada sel-sel tubuh terutama perubahan makromolekul seperti DNA, lipid, dan protein (Jones 2008; Evans *et al.*, 2004).

## 1.6 Mekanisme Toksisitas Oksigen

Radikal bebas diproduksi dari ketidakseimbangan banyak faktor, dan ROS diproduksi baik secara endogen maupun eksogen. Sumber endogen dari ROS adalah mitokondria, metabolisme sitokrip P-450, peroxisome, dan aktivasi sel inflamasi. Pada umumnya ROS dapat terbentuk dari radiasi sinar UV atau X-Ray dan GAMMA ray, produksi ROS selama reaksi katalis metal., saat atmosfer dipenuhi polutan, diproduksi oleh neutrofil, eosinofil, dan makrofag selama inflamasi dan melalui produksi sampingan katalis mitokondria saat transpor elektron dan berbagai macam mekanisme lainnya.

### 1.6.1 Produksi ROS Dari Respirasi Mitokondria

Oksigen pada udara bebas masuk ke dalam tubuh melalui saluran pernafasan melalui proses pertukaran udara, oksigen masuk ke darah

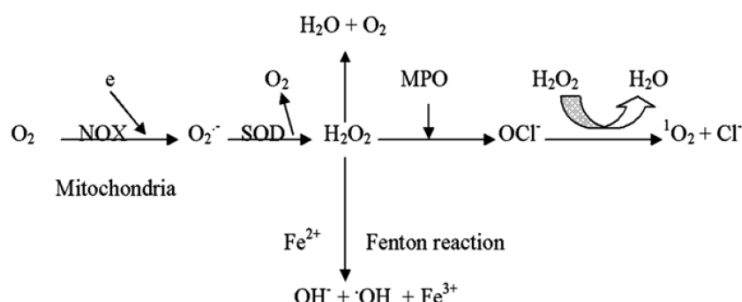
menuju organ. Oksigen dibutuhkan untuk pembentukan ATP di mitokondria melalui proses glikolisis, siklus Kreb's dan fosfolirasi oksidatif. Fosfolirasi oksidatif merupakan proses pembentukan ATP yang dihasilkan oleh transfer elektron dari NADH dan FADH<sub>2</sub> sebagai pembawa elektron (Keilin, 1996).

Fosfolirasi oksidatif terbagi menjadi beberapa tahapan yang disebut kompleks. Kompleks 1 yaitu proses dehidrogenasi dari NADH. Kompleks 1 terjadi transfer ion H<sup>+</sup> dari NADH menuju koenzim Q dan protons dari matriks mitokondria menuju ruang intermembran mitokondria. Kompleks II merupakan proses dehidrogenasi succinate yang berikatan dengan FAD yang dihasilkan oleh Siklus Kreb's. Perpindahan elektron succinate menuju koenzim Q. Kompleks II elektron berpindah dari succinate menuju oksigen yang akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Superoksida radikal dan hidrogen peroksida merupakan ROS yang dihasilkan pada proses kompleks II. Kompleks III merupakan transfer elektron dari koenzim Q menuju Cytochrome C. Kompleks IV disebut juga cytochrome oxidase. Elektron yang dibawa oleh cytochrom C akan di transfer menuju oksigen (Brandt, 1997).

Beberapa tahapan fosfolirasi oksidatif merupakan tahapan reduksi oksigen dan mempunyai potensial besar untuk menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif atau ROS. Oksigen yang tereduksi akan menjadi superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) yang terbentuk diantara kompleks I dan kompleks III. Superoksida merupakan radikal bebas yang sangat reaktif dan dapat merusak enzim, membran lipid, dan asam nukleat (Saphira, 2002). Kemampuan sel untuk mencegah kerusakan oksidatif yang disebabkan oeh

$O_2^-$  yaitu dengan cara pembentukan enzim superoksida dismutase. Superoksida dismutasi akan mereduksi  $O_2^-$  menjadi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  (McCord, 2002). Pembentukan dan pembersihan radikal bebas seimbang didalam sel normal. Hal ini dapat dilihat pada gambar 2.8. Meskipun begitu, bila pembentukan ROS lebih banyak atau kadar antioksidan jumlahnya lebih sedikit, sel akan masuk dalam fase stres oksidatif. Bila fase ini panjang, maka sel akan rusak dan mati (Patel *et al.*, 2003)

Efek hiperoksida dengan cara pemberian oksigen berlebih pada enzim di hepar, diantaranya aktifitas enzim hepatic glucose 6-phosphatase dehidrogenase, isositrate dehidrogenase (larut), dan gliresaldehida 3-phosphate di monitor selama 2 minggu paparan oksigen 5lb/in<sup>2</sup> 100% menunjukkan bahwa hanya kadar enzim hepatic glucose 6-phosphatase dehidrogenase yang meningkat secara signifikan dalam 24 jam pertama paparan dan penurunan lebih dari 14 hari dibandingkan dengan faktor kontrol dan menunjukkan penurunan produksi atp di dalam sel yang menyebabkan sel kekurangan energi dan rusak (Gorman *et al* dalam Jaeschke, 2011). Penelitian lain menunjukkan Starke dan Farber 1985 telah mempelajari mekanisme hidrogen peroksida dan membunuh sel pada hepatosit tikus berbudaya primer beberapa jam sampai satu hari dengan durasi kultur (Jaeschke, 2011). Peningkatan radikal bebas juga menurunkan aktivitas enzim lipoprotein lipase (LPL) yang menyebabkan terjadinya akumulasi trigliserida (TG) dalam sel hati dan terjadi degenerasi lemak sel hati (Goldberg, 2001).



**Gambar 2.8** : Pembentukan ROS di neutrophil (Kenher and Klotz, 2015)

### 1.6.2 Pembentukan ROS akibat Kerusakan Hepatosit

Kerusakan hepatosit merangsang pengeluaran *Alarmins* pada sel imun yang didapat seperti sel kuppher, neutrophil dan lain-lain. Alarmins atau DAMPS merupakan mediator inflamasi. Aktivasi neutrofil dengan cara mengaktifkan NADPH oksidase (Jaeschke, 2011)

#### a. Produksi ROS oleh Sel Fagosit

Stimulasi untuk produksi ROS dari sel fagosit awalnya disebut dengan "ledakan respirasi" berdasarkan peningkatan penggunaan oksigen dari banyak sel tersebut. Proses ini dikatalis dari oksidasi NADPH, kompleks enzim membran multikomponen, yang penting dalam aksi bakterisid dari fagositosis (Hancock *et al*, 2007). Saat beberapa enzim dikenal mampu untuk produksi moieties ROS, oksidasi NADPH adalah yang paling signifikan. Aktivitas oksidasi NADPH dikontrol melalui sistem kompleks regulasi yang memakai peran protein-G rac (Bacoch *et al*, 2002)

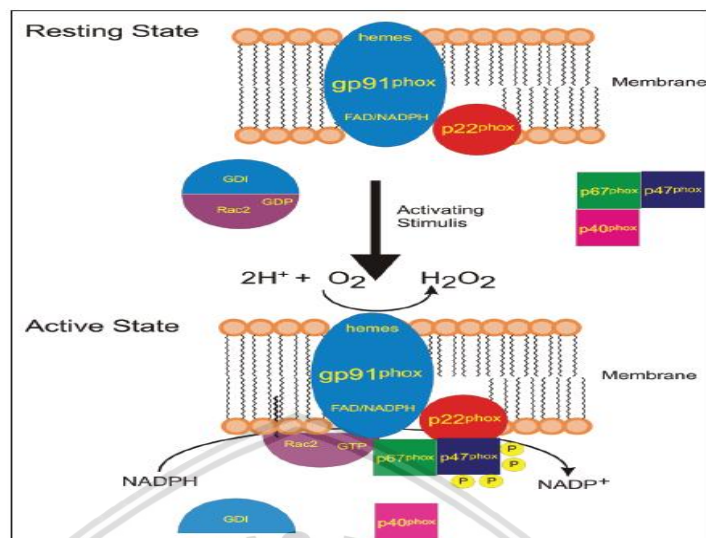


Figure 2. Schematic illustration of the activation of NADPH Oxidase.

**Gambar 2.9 :** Sistematika aktivasi NADPH oksidasi (Held, 2015)

Pada fase istirahat sel, membran menancapkan dua polipeptide heterodimer (p22-phox dan gp91-phox), yang juga mengandung dua grup heme sebagaimana grup FAD, yang mampu mentransfer elektron dari NADPH sitosolik menembus membran menuju molekul oksigen tanpa aktifitas oksidasi NADPH. Dapat dipastikan bahwa beban kompensasi terjadi ketika polipeptide gp91-phox juga berfungsi sebagai channel ion  $H^+$ . Selama stimulasi, jumlah polipeptide (p47-phox, p67 phox dan p40 phox) translokasi dari bagian permukaan dalam membran plasma menjadi bentuk kompleks enzim aktif yang menguasai aktifitas NADPH oksidase. Proses yang mirip dengan hal ini dipercayai juga terjadi di sel non fagosit (Lambert *et al.*, 2000)

Enzim peroxide lain yang sering dieskpresikan di neutrofil adalah myeloperoxidase (MPO), berperan sebagai kofaktor dalam memproduksi hypochlorous acid (HOCL) dari hidrogen peroksida dan anion klorida. MPO juga

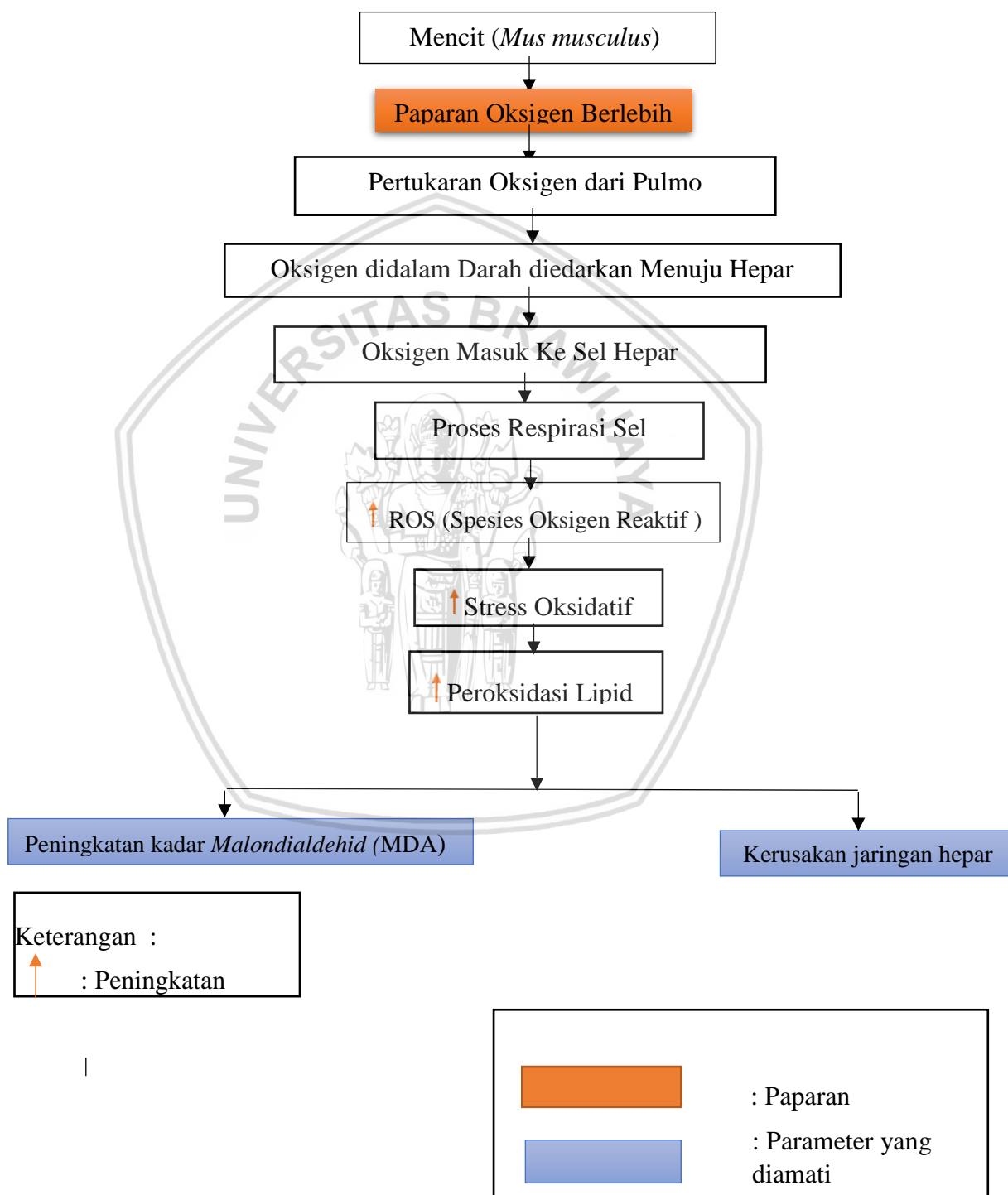


mengoksidasi tyrosine menjadi radikal tirosine yang sitotoksik dan digunakan neutrofil sebagai mekanisme pertahanan terhadap organisme (Forman *et al.*, 2002).



## BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



Mencit (*Mus musculus*) jantan diberikan paparan oksigen murni 100 % sebanyak 0,5 FIO<sub>2</sub> menjadi 5 LPM pada kelompok mencit pertama 0,6 FIO<sub>2</sub> menjadi 6 LPM kepada kelompok mencit kedua dan 0,7 menjadi 7 LPM kepada kelompok mencit ketiga dan kelompok terakhir dibiarkan dengan kandang terbuka. Oksigen masuk ke dalam pulmo terjadi pertukaran oksigen di pulmo, kemudian oksigen diedarkan oleh eritrosit melalui pembuluh darah keseluruh tubuh dan masuk ke dalam hepar melalui arteri hepatica dan masuk ke dalam sel. Setelah masuk ke dalam sel terjadi proses respirasi sel, oksigen akan berubah menjadi O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan hasil sampingan dari pembuatan ATP dan reaksi enzimatik. Pemberian oksigen berlebih menyebabkan ROS meningkat dan *super oxide dismutase* SOD tidak mampu menetralkan ROS.

Radikal bebas ini menyebabkan peroksidasi lipid, inaktivasi enzim selular, normalnya beberapa enzim antioksidan seperti glutathion peroksidase, katalase, dan superoksida dismutase melindungi tubuh dari banyak radikal bebas ini, tapi pada kondisi hiperoksida, banyaknya produksi radikal bebas yang dihasilkan membuat sistem enzim lemah dan akhirnya banyak radikal bebas yang tidak diinaktivasi. Peningkatan peroksidasi lipid mengakibatkan kerusakan membran sel sehingga PUFA tersebut berubah menjadi MDA, hal ini menyebabkan MDA di hepar meningkat. Efek hiperoksida pada enzim di hepar, menunjukkan bahwa hanya kadar enzim hepatic glucose 6-phosphatase dehidrogenase yang meningkat dan dapat menyebabkan kerusakan sel hepar seperti hepatosit. Penelitian Ben dkk, yang melakukan uji histopatologi setelah paparan radikal bebas pada hepar serta ginjal dimana efek merusak dari stres oksidatif dihadapang oleh mekanisme pertahanan

natural melalui enzim oksidatif, ditunjukkan dengan peningkatan kadar SOD pada hepar. Hepar tampak nekrosis, infiltrasi sel leukosit dan vakuolisasi hepatosit, ditandai dengan peningkatan biomarker toksisitas hepar, yakni AST dan ALT (Bendkk, 2017). Penelitian lain oleh Nuno dkk pada tahun 2012, yang meneliti gambaran histologi yang diinduksi oleh N-Diethylnitrosamine sehingga menghasilkan radikal bebas pada hepar, menunjukkan adanya perubahan pada histologi, diantaranya mitosis, hiperplasia, perubahan inti sel, area yang nekrosis serta apoptosis. (Nuno dkk, 2012).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

- 1) Pemberian oksigen berlebih dengan konsentrasi tinggi dapat meningkatkan kadar MDA (*Malodialdehida*) hepar mencit *Mus musculus*.
- 2) Pemberian oksigen berlebih dengan konsentrasi tinggi dapat mempengaruhi histopatologi hepar mencit (*Mus musculus*).



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan UIN Malang, FAAL Universitas Brawijaya, laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai Maret 2018.

### 4.2 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain Balb/C berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 20-30 gram 20 ekor dibagi dalam lima kelompok.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan yang digunakan adalah rancangan eksperimental sederhana dengan membagi 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari 5 ekor hewan coba. Kelompok 1 adalah mencit yang tidak diberi paparan, hanya diberi pakan berupa ransum basal berbentuk pellet BR1 serta diberikan air minum aquadest (kontrol negatif). Kelompok 2 adalah mencit yang diberi paparan oksigen berlebih dengan aliran oksigen 5 LPM atau konsentrasi  $FIO_2$  0.5 selama 12 jam dalam waktu 7 hari. Kelompok 3 adalah mencit yang diberi paparan oksigen berlebih dengan aliran oksigen 6 LPM atau konsentrasi  $FIO_2$  0.6 selama 12 jam dalam waktu 7 hari. Kelompok 4 adalah mencit yang diberi paparan oksigen berlebih dengan aliran oksigen 7 LPM atau konsentrasi  $FIO_2$  0.7 selama 12 jam dalam waktu 7 hari.



**Tabel 4.1** Rancangan kelompok Penelitian

Perlakuan	Ulangan				
	1	2	3	4	5
Kontrol negatif  Tanpa diberi paparan oksigen berlebih					
Perlakuan 1  Paparan oksigen sebanyak 5 LPM					
Perlakuan 2  Paparan oksigen sebanyak 6 LPM					
Perlakuan 3  Paparan oksigen sebanyak 7 LPM					

#### 4.4 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa mencit putih (*Mus musculus*) jantan strain wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 15-35 gram. Menurut Kusurningrum (2008), estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus:

$t (n-1)$	$\geq 15$	Keterangan:
$4 (n-1)$	$\geq 15$	$t$ = Jumlah kelompok perlakuan
$4n - 4$	$\geq 15$	$n$ = Jumlah ulangan yang diberikan
$4n$	$\geq 19$	
$n$	$\geq 4,7$ dibulatkan 5	

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan minimal 5 kali dalam setiap kelompok dan hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor.

#### 4.5 Karakteristik Sampel Penelitian

##### 4.5.1 Kriteria Inklusi

Mencit putih (*Mus musculus*) strain balb/C dengan umur 8-12 minggu. Berat badan rata-rata 20-30 gram. Jenis kelamin jantan, sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, tidak cacat, dan matanya jernih.

##### 4.5.2 Karakteristik Eksklusi

Mencit putih yang mati saat penelitian.

#### 4.6 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Perbedaan aliran oksigen (liter per menit).

Variabel terikat : Kadar Malondialdehida (MDA) dan gambaran histopatologi hepar.

Variabel kontrol :Mencit putih (*Mus musculus*) jantan strain balb/c, berat badan, suhu, kelembapan kandang, dan pakan.

## 4.7 Alat dan Bahan

### 4.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

Kandang pemeliharaan berukuran 30x30x20 cm yang terbuat dari plastik polyvinyl dengan tutup jaring jaring dari bahan stainless steel sebanyak 4 buah.

Kandang perlakuan berukuran 30x30x20 cm, semua sisi kandang tertutup rapat dan terdapat dua lubang disalah satu sisi sebagai jalur induksi yang disalurkan ketabung oksigen, lubang pertama untuk udara keluar, dan lubang kedua untuk jalur masuknya oksigen (Rivkin, 2015).

Peralatan untuk pembuatan preparat irisan hitologis adalah bak paraffin, dissecting kit, kertas label, botol flakon, gelas objek, gelas penutup, oven, *rotary microtome*, staining kit, base molt, holder, cawan petri, hot plate, pipet tetes, mikroskop cahaya, micrometer objektif, dan micrometer okuler.

Alat untuk pengukuran kadar MDA, yaitu spektrofotometer.

**4.7.2** Bahan yang digunakan dalam penelitian ini mencit putih strain Balb/C jantan, pakan mencit standar, oksigen 100%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *aquadest*, NaCl fisiologis, *xylol* bertingkat, alkohol bertingkat, serum darah, PFA 4%, blok parafin, pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE), alkohol 70%, alkohol 90%, dan alkohol 95%.

## **4.8 Prosedur Penelitian**

### **4.8.1 Pembagian Kelompok Mencit**

Mencit yang digunakan sebanyak 20 ekor, dimana terbagi menjadi 4 kelompok perlakuan dan masing-masing perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit. Pembagian kelompok sebagai berikut:

Kelompok pertama sebagai kontrol negatif. Mencit tanpa paparan oksigen berlebih. Kelompok kedua adalah kelompok mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan  $FIO_2$  0.5 selama 12 jam dalam waktu 7 hari. Kelompok ketiga adalah kelompok mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan  $FIO_2$  0.6 selama 12 jam dalam waktu 7 hari. Kelompok keempat adalah kelompok mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan  $FIO_2$  0.7 selama 12 jam dalam waktu 7 hari.

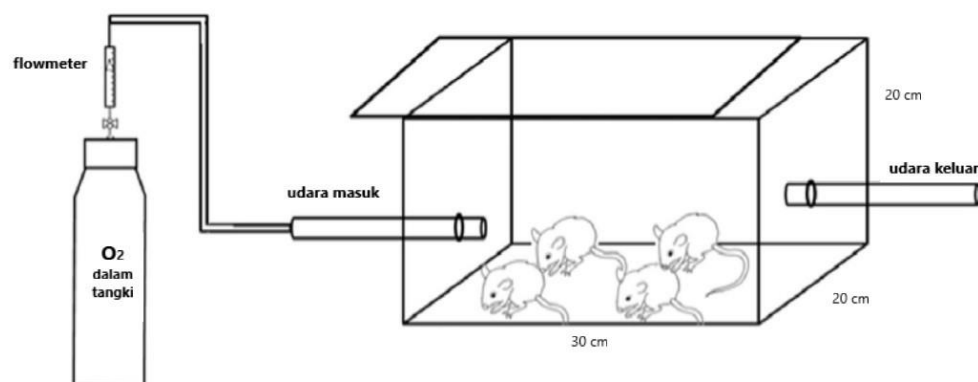
Penelitian Antoine Lavoisier pada tahun (1783) mengenai paparan  $O_2$  dengan konsentrasi  $FIO_2$  sebesar 1,0 akan menyebabkan kematian pada marmut. Paparan oksigen selama beberapa hari dengan konsentrasi  $FIO_2 > 0,8$  dapat menyebabkan kematian pada hewan (Kallet *et al.*, 2013).

#### 4.8.2 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba. Mencit diberikan ransum basal basal berbentuk pelet dengan tipe BR1 dan diberikan aquades secara *ad libitum* serta dipelihara pada ruang bersuhu 26-27<sup>0</sup>C dengan kelembapan 50-60% (Lina, 2003).

#### 4.8.3 Pemberian Oksigen berlebih

Oksigen yang diberikan pada hewan coba adalah oksigen 100% dalam bentuk gas yang dialirkan dari tangki tabung oksigen yang didapat dari CV. CBS melalui selang berdiameter 5 mm ke dalam kandang perlakuan mencit. Oksigen dialirkan 12 jam selama 7 hari. Konsentrasi FIO<sub>2</sub> diberikan kepada masing masing kelompok dengan konsentrasi yang telah disesuaikan yaitu 0.5, 0.6, dan 0.7 (Kallet, 2013). Paparan dilakukan pada kondisi lingkungan standard yang bersuhu  $\pm 24^{\circ}\text{C}$  bertekanan 1 ATM (Kemenkes, 2004). Ukuran kandang dibuat dengan ukuran panjang 30cm lebar 20cm dan tinggi 20cm dan terbuat dari bahan acrylic. pemaparan dilakukan secara kelompok, hal ini dilakukan guna menghindari perbedaan perlakuan kepada masing-masing hewan coba (Rivkin, 2015). Kandang tersebut dapat ditinjau pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1 :** Kandang inhalasi (Rivkin *et al.*, 2015).

#### 4.8.4 Pengambilan Hepar Mencit (*Mus musculus*)

Pengambilan organ hepar hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) dilakukan pada hari ke-8. Prosedur pertama yang dilakukan untuk pengambilan organ hepar adalah hewan coba dieuthanasia dengan cara dislokasi pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Mencit diletakkan secara rebah dorsal di papan bedah dan pembedahan dilakukan pada bagian abdomen. Kemudian diambil organ heparnya. Setelah organ hepar terambil, dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dan dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 untuk pemeriksaan MDA dan sebagian hepar dimasukan ke dalam larutan *paraformadehyde* 10% untuk pemeriksaan histopatologi.

#### 4.8.5 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu merendam organ hepar dalam PFA 4% selama 24 jam. Tujuan dilakukannya fiksasi adalah untuk mencegah kerusakan jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Menurut Junqueira (2005) proses pembuatan



preparat histopatologi terdiri dari dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, dan *mounting*.

- a. Dehidrasi, yaitu mengeluarkan air dari jaringan agar dapat diisi oleh parafin sehingga dapat diiris tipis. Organ hepar dimasukkan dalam alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit.
- b. *Clearing*, yaitu penjernihan organ. Organ dimasukkan dalam *xylol* I selama 1 jam, *xylol* II selama 30 menit, dan *xylol* III selama 30 menit.
- c. *Embedding*, yaitu organ dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan keparafin blok.
- d. *Sectioning*, yaitu proses pemotongan parafin blok di *microtome*. Ketebalan pemotongan adalah 5µm agar tembus cahaya saat dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop dan direndam pada *water bath* dengan suhu 40°C. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna.
- e. *Mounting*, yaitu penempelan blok parafin yang sudah dipotong ke *object glass*. Setelah ditempel, keringkan diatas *hot plate* 38-40oC sampai kering kemudian disimpan dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati, 2013).

#### 4.8.6 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* memiliki dua fungsi, yaitu *Hematoxylin* untuk memberi warna biru pada inti sel, sedangkan *Eosin* untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel. Prosedur pewarnaan HE adalah:

- a. *Deparafinisasi*, yaitu melarutkan dan menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan. Preparat dimasukkan ke dalam *xylol* bertingkat I, II, dan III masing-masing selama 5 menit.
- b. *Rehidrasi*, yaitu preparat dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, lalu direndam dalam aquades selama 5 menit.
- c. Pewarnaan I, yaitu pewarnaan dengan menggunakan *hematoxyline* selama 10 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna biru pada inti sel.
- d. *Differensiasi*, yaitu preparat dimasukkan dalam *Hydrochloric acid* (HCl) 0,6% selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Tujuan *differensiasi* adalah untuk menghilangkan warna biru yang pekat pada inti sel dan sitoplasma.
- e. *Blueing*, yaitu preparat dimasukkan ke dalam *Lithium carbonat* 0,5% selama 3 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Tujuan *blueing* adalah untuk memperjelas warna biru pada inti sel.

- f. Pewarnaan kedua, yaitu preparat dimasukkan dalam *eosin* selama 3 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma.
- g. *Dehidrasi*, yaitu menghilangkan air dari jaringan. Preparat dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing 5 menit.
- h. *Clearing*, yaitu preparat dimasukkan dalam *xylol* I dan II selama 1 menit dan ditunggu sampai kering.
- i. *Mounting*, yaitu preparat diberi Entelan atau canada balsam dan ditutup dengan *cover glass*. Hal ini bertujuan untuk mengawetkan jaringan yang sudah diwarnai (Jusuf, 2009).

#### 4.8.7 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histologi hepar dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* BX51 dengan perbesaran 100x dan 400x. Pengamatan histopatologi hepar yang di amati adalah sel hepatosit, sinusoid, vena porta, vena sentralis dan semua jaringan di hepar. Pengamatan histopatologi berupa adanya nekrosis, hemoragi, inflamasi jaringan hepar.

#### 4.8.8 Penentuan Kadar Malondialdehida

##### a. Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida

Larutan MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/mL masing-masing diambil 100  $\mu$ L dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambahkan 550  $\mu$ L aquades. Setiap tabung ditambahkan 100  $\mu$ L TCA 100%,

250  $\mu$ L HCl 1N dan 100  $\mu$ L Na-Thio 1%. Kemudian dihomogenkan dengan vortex dan tabung ditutup dengan plastik. Inkubasi tabung tersebut dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin, 2009).

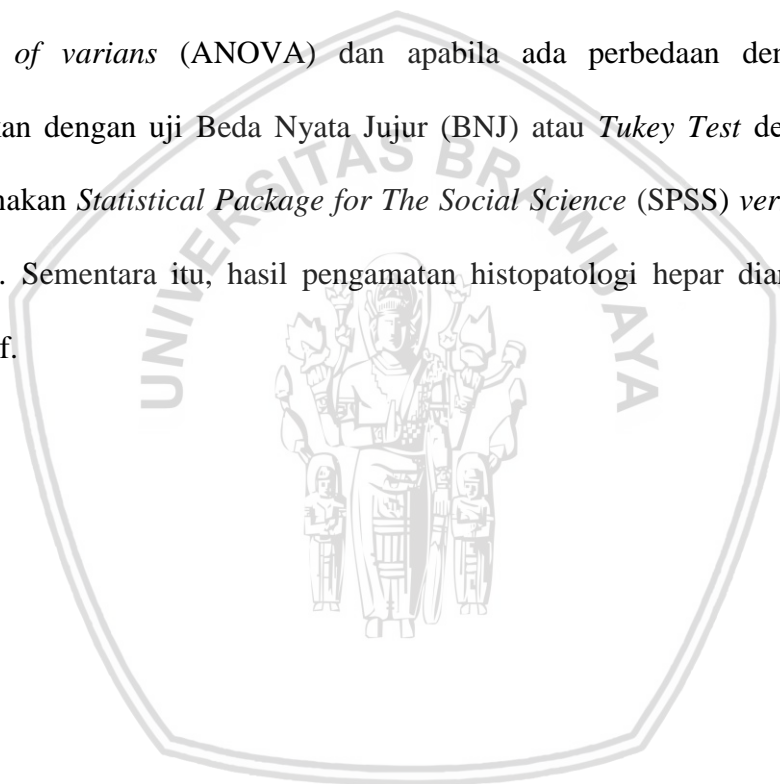
#### **b. Pengukuran Kadar Malondialdehida Metode Spektrofotometri**

Organ hepar sebanyak 0,1 gram dipotong kecil-kecil, kemudian digerus pada mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Tujuan pemotongan kecil-kecil adalah untuk mempermudah penggerusan. Ditambahkan NaCl fisiologis 0,9%, selanjutnya homogenat dipindah ke dalam tabung *microtube* dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil 100  $\mu$ L dimasukkan ke dalam *microtube*, ditambah 550  $\mu$ L akuades, 100  $\mu$ L TCA kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, ditambahkan 250  $\mu$ L HCL 1N lalu dihomogenkan dengan *vortex*, dan ditambahkan 100  $\mu$ L Na-Thio 1% kemudian dihomogenkan kembali dengan *vortex*. Setelah itu, *microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk, dipisahkan ke *microtube* baru. Kemudian dilakukan inkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan disuhu ruang dan sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*) pada panjang gelombang maksimum untuk

uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel.

#### 4.9 Analisa Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kadar malondialdehida dan gambaran histopatologi hepar. Kadar MDA diamati menggunakan uji TBA. Selanjutnya data MDA dilakukan analisis statistika dengan uji sidik ragam *one way analysis of varians* (ANOVA) dan apabila ada perbedaan dengan jumlah dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey Test* dengan  $\alpha = 5\%$  menggunakan *Statistical Package for The Social Science* (SPSS) *version 23.0 for windows*. Sementara itu, hasil pengamatan histopatologi hepar dianalisa secara deskriptif.



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Pemberian Oksigen Berlebih terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Mencit (*Mus musculus*)

Pengukuran kadar MDA dilakukan untuk mengetahui tingkat kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh ROS. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (Repetto *et al.*, 2012). Data yang telah didapat dilanjutkan dengan pengujian normalitas dan homogenitas. Pengujian normalitas menunjukkan data terdistribusi normal dan pengujian homogenitas menunjukkan bahwa data homogen, kemudian data diolah menggunakan uji ANOVA *one way*. Hasil rata-rata data MDA setelah uji ANOVA dapat dilihat pada (**Tabel 5.1**).

**Tabel 5.1** Rata-rata hasil MDA hepar mencit yang dipapar oleh oksigen berlebih

Kelompok	Rata-rata Kadar MDA ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ SD	Peningkatan Kadar MDA (%) terhadap kontrol negatif
Kontrol Negatif (K-)	1219.00 $\pm$ 29.84 <sup>a</sup>	-
Kelompok Perlakuan 1 (K1)	1235.00 $\pm$ 63.95 <sup>a</sup>	1,3%
Kelompok Perlakuan 2 (K2)	1332.50 $\pm$ 89.28 <sup>ab</sup>	9,3%
Kelompok Perlakuan 3 (K3)	1356.00 $\pm$ 65.61 <sup>b</sup>	11,2%

Berdasarkan hasil analisis statistik *One way* ANOVA menggunakan *Statistical Package for Social Science* dengan tingkat kepercayaan 95% menunjukkan perbedaan signifikan pada setiap pasangan kelompok yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $<0,05$  ( $p < 0,05$ ). Hasil uji lanjutan *Tukey test* menunjukkan adanya perbedaan notasi yang berarti terdapat perbedaan pengaruh



perlakuan terhadap masing-masing kelompok. Rata-rata kadar MDA kelompok kontrol negatif (K-) digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan kadar MDA yang terjadi pada setiap perlakuan. Kelompok kontrol negatif memiliki jumlah rata-rata MDA hepar sebesar  $1219.00 \pm 29.84 \mu\text{g/ml}$ , adanya peningkatan kadar MDA tersebut dikarenakan radikal bebas diproduksi sebagai hasil dari proses oksireduktif pada mitokondria dan juga produksi dari aksi enzim seperti xanthin atau urate oksidase sebagai sumber ekstra mitokondria, dari reaksi autooksidasi, dan dari fagositosis selama proses kliren bakteri (Jones *et al*, 2000).

Kelompok perlakuan 1 (K1) diberi paparan oksigen berlebih dengan konsentrasi  $\text{FIO}_2$  0,5 menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA sebesar 1,3% yaitu  $1235.00 \pm 63.95 \mu\text{g/ml}$ . Notasi kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan 1 (K1) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dan menunjukkan peningkatan sebesar 1,3%. Hal ini dikarenakan pada dosis tersebut oksigen yang diberikan belum mampu menyebabkan peningkatan stres oksidatif atau terbentuknya ROS yang berarti. Menurut penelitian Manson (2005) bahwa paparan oksigen menyebabkan toksik pada  $\text{FIO}_2$  tinggi ( $>0,50$ ) selama  $\geq 24$  jam pada tekanan normal (1 ATA). Paparan selama 12 jam menyebabkan kongesti, edema pulmo dan atelectasis (Kallet *et al.*, 2013). Pemberian paparan oksigen 0,5  $\text{FIO}_2$  selama 12 jam belum mampu merusak sampai organ hepar.

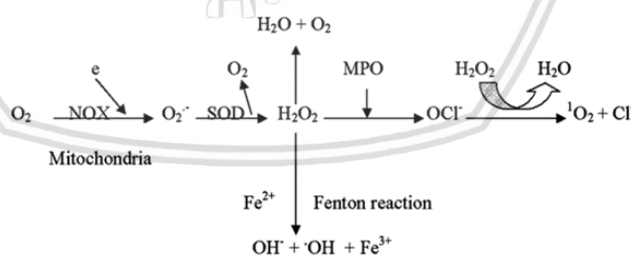
Kelompok perlakuan 2 yang diberikan paparan oksigen dengan konsentrasi  $\text{FIO}_2$  0,6 menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA sebesar 9,3% yaitu  $1332.50 \pm 89.28 \mu\text{g/ml}$  dari kontrol negatif. Perbandingan antara kelompok perlakuan 2 (K2)

dan kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan tidak signifikan ditunjukkan dengan terdapat notasi yang sama. Sesuai dengan penelitian Rech *et al*, (2008) mengenai ukuran ruangan untuk penelitian terapi hiperbarik pada hewan menyatakan kandang dibuat menggunakan akrilik berukuran tinggi 150 mm, tebal 280 mm, dan panjang 690 mm, memiliki satu katup untuk tempat masuk dan keluar oksigen dan satu lubang yang terhubung dengan pengukur tekanan. Penelitian kali ini menggunakan acuan kandang inhalasi penelitian milik Rivkin, *et al* (2015).

Kelompok perlakuan 3 yang diberikan paparan oksigen dengan konsentrasi  $\text{FIO}_2$  0,7 juga menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA sebesar 11,2 %  $1356.00 \pm 65.61 \mu\text{g/ml}$  dari kontrol negatif dimana notasi kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan 3 (K3) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Pemberian paparan  $\text{FIO}_2$  0,7 sampai 0,8 pada mencit mengalami kegagalan respirasi hingga kematian (Mach *et al.*, 2011). Paparan oksigen dengan  $\text{FIO}_2$  0,75-0,90 menghasilkan lesi yang hampir sama dengan paparan  $\text{FIO}_2$  0.95-1.0 (Kallet *et al.*, 2013). Setiap saat tubuh mengalami degenerasi sel untuk memperbaiki sel sel yang rusak. Sel yang rusak akan menghasilkan senyawa MDA, hal ini menyebabkan MDA sebagai biomarker kerusakan jaringan secara fisiologis selalu dihasilkan oleh tubuh (Mudassir dkk, 2012), namun kadar MDA pada hepar meningkat seiring tingginya paparan oksigen pada hewan coba yang diberikan.

Sesuai dengan penelitian Mahdi (2016), menyatakan bahwa seiring tingginya kadar toksik didalam tubuh, maka memaksa tubuh untuk melakukan detoksifikasi yang nantinya menginisiasi ledakan respirasi dimana oksigen yang masuk dalam tubuh melebihi batas normal. Kemudian menurut Auten (2009) yaitu

seiring tingginya kadar oksigen yang masuk maka akan mengakibatkan peningkatan jumlah ROS yang berada didalam tubuh. Oksigen yang masuk kedalam sel akan digunakan untuk menjalankan beberapa proses biokimia salah satunya adalah pembentukan ATP. Tahapan pembentukan ATP, yang meliputi proses glikolisis, siklus krebs, dan transfer elektron, serta pada proses fosforilasi oksidatif, memerlukan oksigen sebagai penerima elektron bebas. Elektron bebas tersebut dihasilkan saat proses pemisahan senyawa hidrogen dari NADH. Ketika oksigen menerima satu muatan elektron, maka oksigen yang tadinya tidak bermuatan akan menjadi senyawa bermuatan negatif ( $O_2^-$ ), sehingga oksigen akan bersifat lebih reaktif. Begitu pula halnya ketika oksigen menerima lebih dari satu elektron bebas oksigen akan berubah menjadi senyawa ROS yang terdiri dari  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , dan  $OH$  (Kenher and Klotz, 2015). Maka dapat dikatakan oksigen berlebih mampu mengakibatkan peningkatan ROS akan diikuti peningkatan biomarker kerusakan jaringan yaitu MDA. Reaksi kimia terbentuknya ROS yaitu :



**Gambar 2.8 :** Proses Pembentukan ROS (Kenher and Klotz, 2015)

Konsentrasi normal oksigen untuk pembentukan ATP adalah sebanyak 0.5 mol, ketika oksigen diberikan secara terus menerus maka jumlah oksigen dalam jaringan juga akan semakin meningkat. Ketika oksigen terlalu banyak maka tidak akan terbentuk ATP melainkan terbentuknya ROS yaitu  $O_2^-$ . Seiring rusaknya

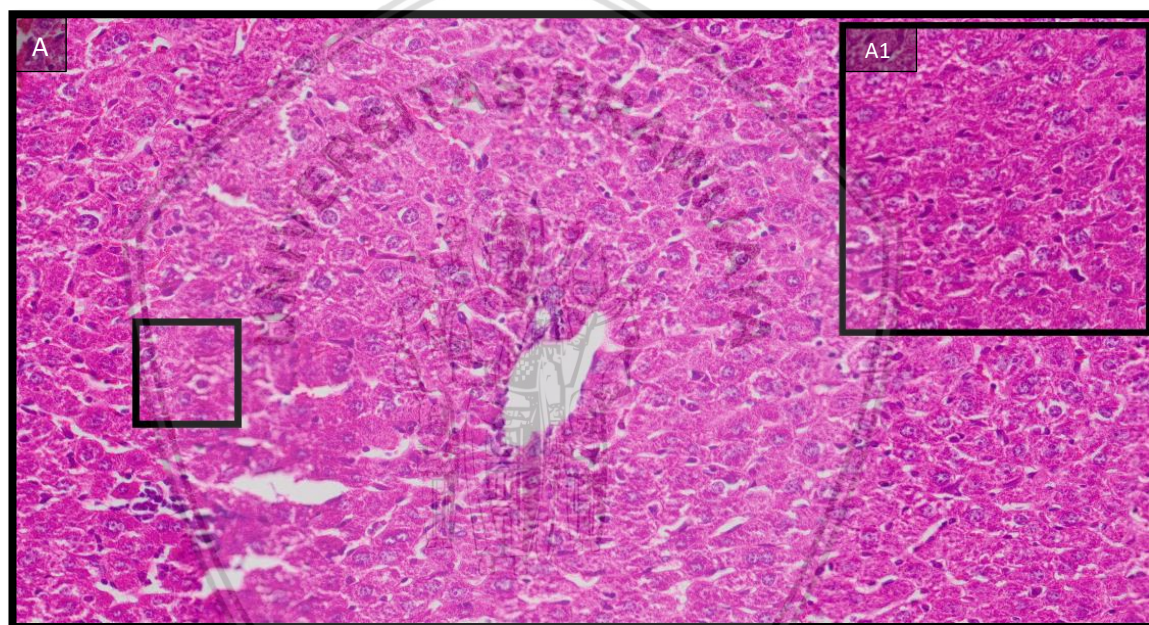
membran sel akibat ROS maka terjadi gangguan sistem enzim dan koenzim yang nantinya diikuti gangguan proses fosforilasi oksidatif sehingga mengakibatkan pembentukan ATP gagal pada sel yang mengakibatkan kematian sel (Mahdi, 2016). Ketika kadar ROS meningkat tajam, homeostasis akan terganggu dan menghasilkan stres oksidatif sehingga menyebabkan kerusakan pada jaringan hepar. Semakin parah kerusakan yang ditimbulkan maka semakin tinggi kadar peroksidasi lipid serum yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan MDA (malondialdehyde) (Shali, 2015).

## **5. 2 Efek Pengaruh Paparan Oksigen Berlebih Terhadap Histopatologi Hepar Mencit (*Mus musculus*)**

Gambaran histopatologi digunakan untuk melihat adanya kerusakan dan tingkat kerusakan yang terjadi pada hepar mencit dari tiap perlakuan. Pengamatan preparat histopatologi hepar meliputi sel hepatosit, sinusoid, vena centralis, vena porta dan arteri hepatica. Gambaran histopatologi mencit kelompok negatif (**Gambar 5.2 A**) menunjukkan struktur hepatosit normal. Inti hepatosit sferis besar dengan nukleus, memiliki lebih dari dua nukleus. Sinusoid memiliki ciri lebar tidak teratur terdiri atas lapisan diskontinu sel endotel. Sel-sel endotel terpisah dari hepatosit dibawahnya oleh suatu lamina basal tipis yang tidak kontiniu dan suatu celah presinusoid (celah disse) yang sangat sempit. Mikrovili hepatosit menonjol ke dalam celah tersebut dan plasma. Vena sentralis memiliki ciri seperti sinusoid, berdinding tipis, dan hanya terdiri atas sel sel endotel yang ditunjang sedikit serat kolagen. Vena sentralis dari setiap lobulus menyatu menjadi vena yang akhirnya membentuk dua atau lebih vena hepatica besar yang bermuara ke dalam vena kava



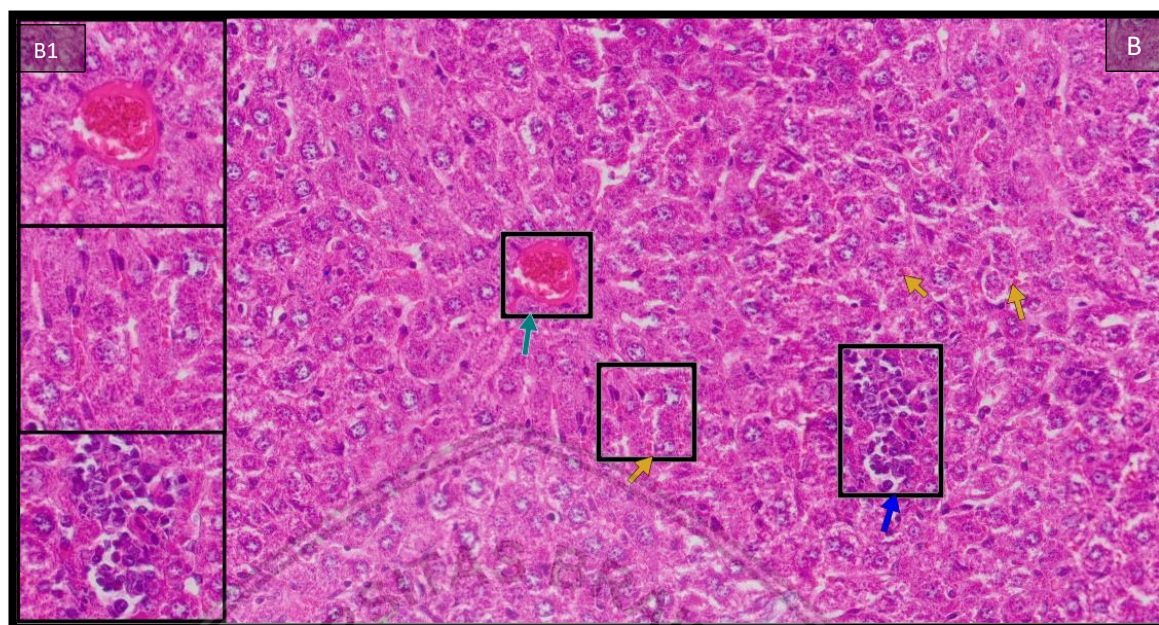
inferior. Vena porta pada hati bercabang menjadi venula porta kecil menuju celah portal. Venula portal bercabang menjadi venula pendistribusi kecil yang berjalan di tepi setiap lobulus dan berujung ke dalam sinusoid. Ateri hepatica bercabang dan membentuk arteriol di area portal dan beberapa diantaranya berakhir langsung ke sinusoid pada jarak jarak tertentu dari celah portal sehingga darah arteri yang kaya oksigen di tambahkan ke darah vena porta di sinusoid (Janquera, 2002).



**Gambar 5.2** A gambaran histologi hepar mencit pewarnaan HE kelompok kontrol negatif perbesaran 100x (A) dan 400X (A1)

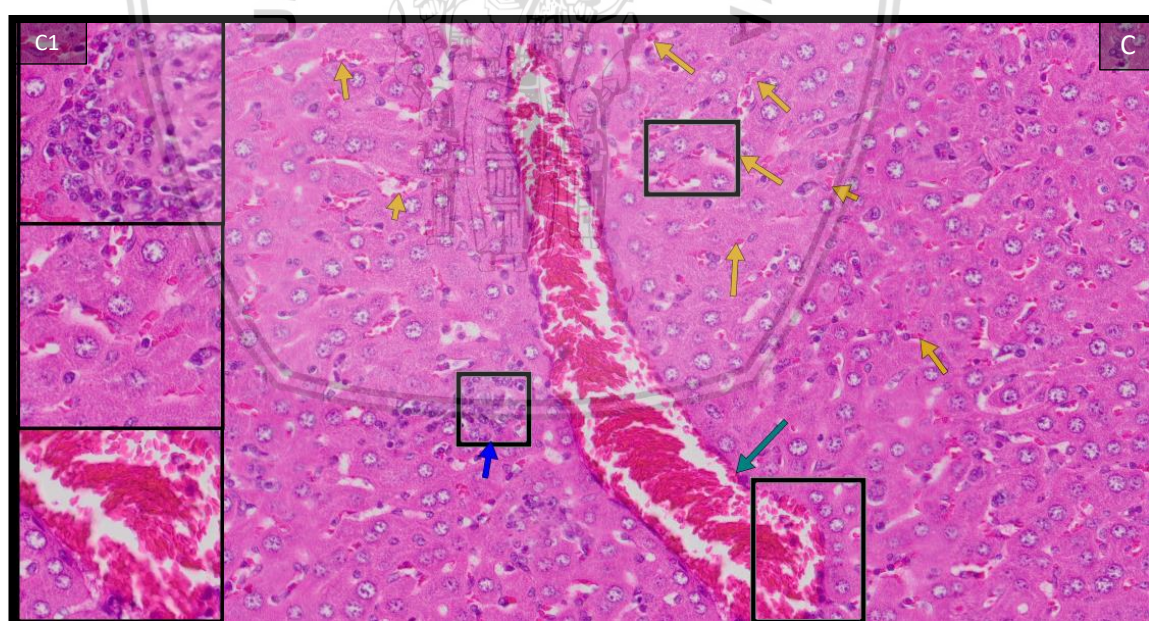
**Keterangan** A. Sel hepar normal terdiri dari vena centralis, hepatosit dan sinusoid  
B. kumpulan sel hepatosit normal.





**Gambar 5.2 B** gambaran histologi hepar mencit pewarnaan HE kelompok perlakuan 1 (FIO<sub>2</sub> 0,5) perbesaran 100x (B) dan 400X (B1)

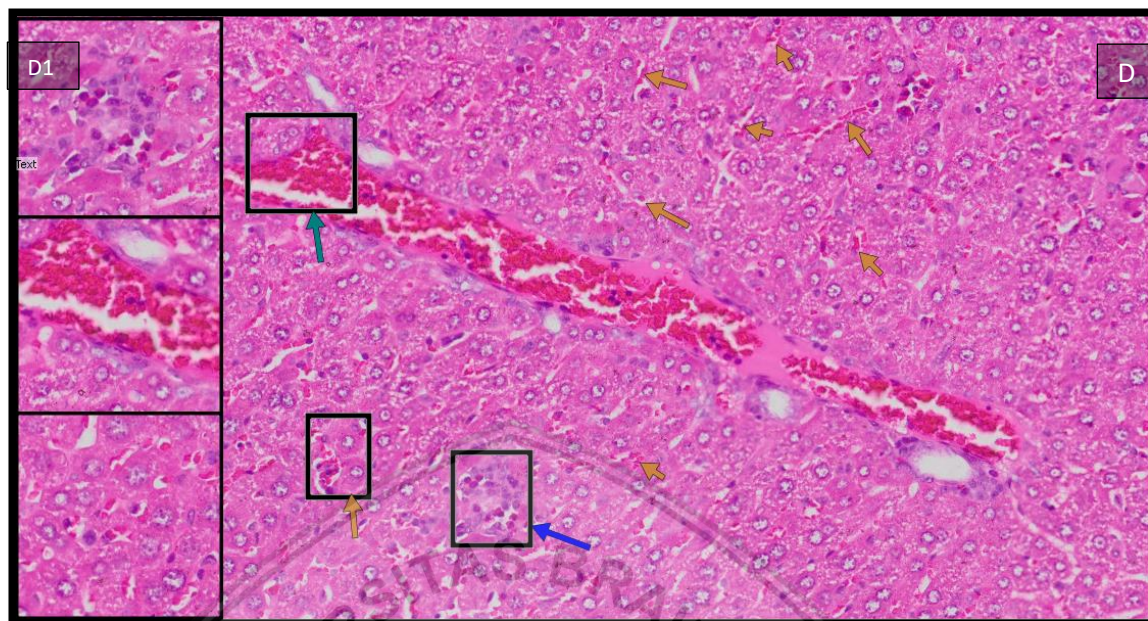
**Keterangan** (↑) kongesti; (↑) inflamasi; (↑) kongesti.



**Gambar 5.2 C** gambaran histologi hepar mencit pewarnaan HE kelompok perlakuan 2 (FIO<sub>2</sub> 0,6) perbesaran 100x (C) dan 400X (C1)

**Keterangan** (↑) kongesti; (↑) inflamasi; (↑) kongesti.





**Gambar 5.2 D** gambaran histologi hepar mencit pewarnaan HE kelompok perlakuan 3 ( $\text{FIO}_2$  0,7) perbesaran 100x (D) dan 400X (D1)

**Keterangan** (↑) kongesti; (↑) inflamasi; (↑) kongesti.

Pemberian oksigen berlebih pada kelompok perlakuan satu (**Gambar 5.2 B**), kelompok perlakuan dua (**Gambar 5.2 C**), dan kelompok perlakuan tiga (**Gambar 5.3 C**) menunjukkan adanya kongesti vena sentralis, inflamasi jaringan hepar, kongesti sinusoid. Kongesti adalah aliran darah keluar dari venous menjadi berkurang atau melambat, kondisi ini lebih bersifat pasif (*passive process*). Penurunan aliran darah dapat bersifat *acute* atau *chronic passive congestions* (Arimbi dkk, 2015). Pada sebuah studi oleh Tsuneyama *et al* (2011) yang meneliti efek menguntungkan dan merugikan dari terapi oksigen pada tikus menyatakan bahwa salah satu kerugian terapi hiperbarik adalah meningkatnya kadar stres oksidatif yang menjadi kunci utama kerusakan sel dan onkogenesis pada hepar tikus. Berdasarkan temuan histologi, stres oksidatif dapat sebabkan kongesti mulai dari ringan hingga berat dan kerosis fokal pada hepar tikus (Radosavjec, 2011).



Mencit kelompok perlakuan pertama mengalami kongesti pada vena sentralis, begitu juga pada mencit kelompok perlakuan kedua dan ketiga.

Terlihat juga banyak inflamasi jaringan hepar pada (**Gambar 5.2 B**) yaitu mencit kelompok perlakuan pertama. Inflamasi atau peradangan merupakan respon biologi kompleks jaringan pembuluh darah terhadap rangsangan berbahaya, seperti agen patogen, sel mati atau rusak, reaksi inflamasi merupakan upaya perlindungan proses tubuh untuk menangkap stimuli yang merugikan dan untuk memulai penyembuhan. Fungsi inflamasi untuk meminimalisir jaringan yang rusak dengan cara mencairkan dan men-onktifkan toksin atau agen infeksius, membunuh dan menyingkirkan mikrobial dan sel neoplasma, memicu faktor pertumbuhan pada jaringan yang rusak (Arimbi dkk, 2015). Inflamasi juga terlihat pada (**Gambar 5.2 B**) dan (**Gambar 5.2 C**) namun tidak sebanyak (**Gambar 5.2 B**). Hasil ini sesuai dengan penelitian Ben dkk (2017) yang melakukan uji histopatologi setelah paparan radikal bebas pada hepar serta ginjal dimana efek merusak dari stres oksidatif dihadapang oleh mekanisme pertahanan natural melalui enzim oksidatif, ditunjukkan dengan peningkatan kadar SOD pada hepar. Hepar tampak nekrosis, infiltrasi sel leukosit dan vakuolisasi hepatosit, ditandai dengan peningkatan biomarker toksisitas hepar, yakni AST dan ALT (Ben dkk, 2017).

Hasil pada **gambar 5.2 D** sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa ROS (*Reactive Oxygen Species*) dapat menyebabkan kaskade kerusakan sel, nekrosis apoptosis, dan meningkatkan respon inflamasi. ROS dapat menginduksi stres pada sel hingga menyebabkan kematian sel. Observasi histopatologi menggunakan mikroskop cahaya ditemukan adanya kongesti sinusoid, vakuolisasi sitoplasma

hepatosit, serta nekrosis pada parenkim hepar (Kihara *et al*, 2005). Nekrosis merupakan kematian sel sebagai akibat dari adanya kerusakan sel akut atau trauma di mana kematian sel tersebut terjadi secara tidak terkontrol yang dapat menyebabkan rusaknya sel dan dilanjut adanya respon peradangan (Arimbi, dkk 2015).

Kongesti pada sinusoid juga terlihat pada histopatologi hepar mencit kelompok perlakuan pertama, kedua dan ketiga. Pada gambaran histopatologi hepar kelompok perlakuan satu (**Gambar 5.2 B**) mengalami sedikit kongesti pada sinusoid dibandingkan dengan mencit kelompok perlakuan kedua dan ketiga. Terlihat (**Gambar 5.2 D**) yaitu mencit kelompok perlakuan ketiga mengalami kongesti sinusoid lebih parah dibandingkan dengan mencit kelompok perlakuan satu dan kedua.

Berdasarkan Jain (2017) yang menyatakan bahwa tingginya jumlah oksigen dalam tubuh akan mengakibatkan meningkatnya ROS. *Reactive Oxygen Species* merusak jaringan dengan mengambil elektron yang terdapat pada gugus fosfat di membrane sel maupun membrane mitokondria, hilangnya elektron tersebut akan mengakibatkan kerusakan mitokondria yang nantinya mengakibatkan gagalnya pembentukan ATP, ketika ATP tidak terbentuk maka sel akan mengalami nekrosis. Kematian sel tersebut dikatakan stres oksidatif karena terjadi proses pelepasan elektron akibat radikal bebas. Hasil gambaran histopat menunjukkan bahwa oksigen yang diberikan diatas konsentrasi normal dan dalam kurun waktu 12 jam mampu mengakibatkan kerusakan jaringan pada hepar.



## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian paparan oksigen berlebih dapat meningkatkan kadar MDA. Pemberian dengan konsentrasi  $\text{FIO}_2$  0,7/kandang 12 L/ 5 ekor mencit dapat meningkatkan kadar Malondialdehida (MDA) sebesar 11,2 %.
2. Pemberian oksigen berlebih mempengaruhi gambaran histopatologi hepar mencit berupa tampak adanya kongesti sinusoid, kongesti vena centralis dan inflamasi jaringan hepar.

### Saran

Perlu dilakukan pembambilan sampel darah mencit untuk mengetahui adanya peningkatan oksigen di dalam tubuh. Penelitian ini bisa dilanjutkan untuk mengetahui lebih jauh kerusakan sel melalui uji kadar SOD, enzim protease dan uji  $\text{TNF-}\alpha$ . Pada penelitian selanjutnya dapat pula diaplikasikan pada mencit yang diinduksi penyakit tertentu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar dan Budhi. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta : Adbia Press.
- Ali ,S., Maryam, and M. Heidari. 2014. Diseases Treated with Hyperbaric Oxygen Therapy. A literature review. Med Hyp Discov Innov Interdisciplinary.
- Amin, M.H.F., A.P.W. Marhendra, dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma. Paper Presentasi pada Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang*. 437-447.
- Asali, A. R., 2010. *Terapi Oksigen Hiperbarik: Solusi Baru Hidup Sehat*. [Online] Availableat:<https://www.tanyadok.com/tekno/terapi-oksigen-hiperbariksolusi-baru-hidup-sehat>
- Auten, Richard L,Jonathan M., and Davis., 2009. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. Pediatric Research. Department of Pediatric, Duke Medical Center. Boston.
- Ben.S.H., Ahmed.H., Awatefl. E., Choumous.K., Ons.B., Mounir.K.Z., and Najibal. Z. 2017. *Oxidative stres and histopathological changes induced by methiltiophanate, a systemic fungicide, in blood, liver and kidney of adult rats*. African Health Science Vol 17 issue 1
- Bokoch, G.m. and B.D. Diebold. 2002. *Current Molecular Models for NADPH Oxidase Regulation by Rac GTPase*.
- Blood. Brand,U., and Trumpower, B. 1994.*The Protonmotive Qcycle in Mithochondria and Photosynthetic Bacteria*. Crit Rev. Biochem. Mol. Biol. 29 165-167
- Cesaratto, L., Vascotto, C., Calligaris, S. and Tell, G. 2004. *The importance of redox state in liver damage*. Ann. Hepatol. 3(3): 86-92.
- Chargui.I., Intissar. G., Fatma. B., Yahia. H. M., Samir. H., Zohra. H., and Hassen. B., 2012. *Oxidative Stres, Biochemical and Histopathological Alterations in the Liver and Kidney of Female Rats Exposed to Low Doses of Deltamethrin (DM): A Molecular Assessment*. Biomed Environ Sci, 2012; 25(6):672-683.
- Chris DL and Caroline O. 2008. *Hyperbaric oxygen therapy: A rapid assesment*. KCE report vol 74. Belgia, 2008
- Diaz. 2006. Efek Hepatoprotektor Ekstrak Etanol 50% Jamur Lingzhi (Ganoderma lucidium) pada Tikus Jantan yang diinduksi Paracetamol. Karya Tulis Akhir tidak diterbitkan. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Dickerson, K. H. 1964. *NADC-ML- 6403, U.S. Naval Air Development Center*.

- Edward and Melissa L. 2010. *Hyperbaric oxygen Therapy. Part 1: History And Principles. Journal of Veterinary Emergency and critical care.* Veterinary Emergency and critical care society. California.
- Forman, H.J. and M. Torres. 2002. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling, Respiratory Burst in Macrophage Signaling, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:s4-s8.
- Goldberg, I.J. and M. Merkel. 2001. *Lipoprotein Lipase, physiology, biochemistry and molecular biology.* Front Biosci 6:D388.
- Guyton and Hall. 2008. *Textbook Medical Physiology.* Philadelphia : Elsevier Saunder. 11 Edition
- Hancock, J.T., R. Desikan and S.J. Neill. 2001. Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways. *Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification*, 29(2):345-350.
- Held. P. 2015. *An Introduction to Reaktive Oxygen Species Measurment Of ROS in Cells.* diakses 20 februari 2018
- Horton, A. A. and Faikhurst. S. 1987. *Lipid per- oxidation and mechanisms of toxicity.* ( 'RC Crit. R~,I Tuicol 18, 27-79. JONES, D. P.. THOR. H..
- Jain and Kewal K. 2017. *Textbook of Hyperbaric Medicine 6<sup>th</sup>.* Springer. Basel. Switzerland
- Jaeschke, H. 2011. *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts.* JGFC Gastroenterology and Hepatology. 6592 173..179
- Jones, D. P. Thor. H. Andersson. B., and Orriu- Ius, S. 2008. *Detoxification reactions in isolated he- patocytes.* J. Biol. C'hem. 253,603 I-6037.
- Jones, D.P. 2000. Redox Potential of GSH/GSSG Couple: Assay and Biological Significance. *Methods of Enzymology*, 348:93-112.
- Janqueira, L. C., and J. Carneiro. 2005. *Basic Histology Text and Atlas: Female Reproductive System. 11<sup>th</sup>ed.* United States of America: McGraw Hill
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar.* Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Kallet H. Richard and Michael A. Matthay. 2003. *Hiperoxidic Acute Lung Injury.* Daedalus Enterprise.[Respir Care 2013;58(1):123-140.
- Kawasima M, Tamura H, Nagayoshi I, Takao K, Yoshida K and Yamaguchi T. 2004. *Hyperbaric oxygen therapy in orthopedic conditions.* Undersea Hyperb Med. 31(1):155-62
- Kemal S. Sadir.S. and Oter. S. 2015. *The relation of hyperbaric oxygen with oxidative stres - reactive molecules in action .* Med Sci Vol 4 Issue 1
- Kementrian Kesehatan. 2004. *Persyaratan Kesehatan Lingkungan Rumah Sakit.* KEPMENKES RI no. 1204/MENKES/SK/X/2004.



- Keilin D. 1996. *The History of Cell Respiratory and Cytochrome*. London: Cambridge University Press
- Kihara, K., Ueno, S., Sakoda, M and Takashi, A. 2005. *Effects of Hiperbaric Oxygen Exposure on Experimental Hepatic Ischemia Reperfusion Injury: Relationship Between its Timing and Neutrophil Sequestration*. Liver Transplantation, Vol 11 No 12:pp 1574-1580
- Kusriningrum, R.S. 2008. *Perancangan Percobaan: Untuk Penelitian Bidang Biologi, Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kedokteran, Kedokteran Hewan, Farmasi*. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lambeth, J., G. Cheng, R. Arnold, and W. Edens. 2000. Novel Homologs of gp91phox. TIBS 25:459-461.
- Lane and Nick. 2002. *Oxygen The Molecule That Made The World*. Oxford University Press. New York
- Lina, H.S., S. Listyawati, dan Sutarno. 2003. *Analisis Kimia – Fisika Urin Tikus Putih (Rattus norvegicus) Setelah Pemberian Daun Seledri (Apium graveolenslinn)*. *Journal of Biosmart* 1 (5): 43 – 46.
- Mach, W., A. R. Thimmesch, J. T. Pierce, and J. D. Pierce. 2011. Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen in the Lung. Hindawi Publishing Corporation. Nursing Research and Practice Volume 2011, Article ID 260482
- Mahdi, Chanif. 2016. *Antioksidan, ROS dan Radikal Bebas Serta Dasar Imunologi*. Jaya Mayantara.
- McElwee, M.K., Song, M.O. and Freedman, J.H. 2009. *Copper activation of NF- $\kappa$ B signaling in HepG2 cells*. *Journal of Molecular Biology* 393(5): 1013-1021.
- Mudassir, A. Aziz., and A.Q.Punag., 2012. *Alaysis Plasma malondialdehida Contents of Patient With Nasal Polyps Based On Inflammation Cell Domination Trough*. *Jurnal Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin*.4-5
- Ontario Best Hospita Group. 2010. *Paramedic Resource Manual*. Ontario Base Hospital Group
- Otaria,S. 2008. *Terapi Oksigen Hiperbarik*. [Online] Available at: <http://klikdokter.com/healthnewstips/tips-hidup-sehat/terapi-oksigen-hiperbarik>. diakses pada 18 april 2018.
- Randall, R., Keitha, Crist, Pandjamese and Klaunig. 1988. Effects of Culture Duration on Hydrogen Peroxide-Induced Hepatocyte Toxicity. Departments Pathology. tSurgery, and SPharmacology, Medical College ofOhio. Toledo. Ohio 43699
- Rech, F, V., Djalma, J, F., Reginaldo, H., Henri, C, R., and Anna, L, N, F., 2008. *A proposal of multiplace hyperbaric chamber for animal experimentation and veterinary use*. *Acta Cirúrgica Brasileira* Vol. 23. Brazil



- Rivkin, I., Yifat, G. G., Inbar, E. G., Amichay, A., Arik, E. and Rimona M. 2015. *Treatment of Respiratory Damage In Mice by Aerosol of Drug-encapsulating Targetes Lipid-Based Particles*. Elsevier
- Robbins and Cotran. 2010. *Pathologic Basis Disease*. Edisi ke-8. W. B. Saunders, Philadelphia. 891-892, 895-896, 1130-1131, 1143.
- Shali L., Tan. Y. H., Wang. N., Zhang. J. Z., Lao. L., Wong. W. C., and Feng. Y. 2015. *The Role of Oxydative Stres and Antioxidants in Liver Disease*. Receive: 12 August 2015; Accepted: 19 October 2015; Published: 2 November 2015. Int.J.Sci.hal; 26087-26124
- Soewolo. 2010. *Pengantar Anatomi Fisiologi Hewan*. Jakarta : Dirjen Dikti Depdiknas
- Sourabh, B. and Guruswamy. 2012. Hyperbaric Oxygen and Wound Healing. Indian J plas Surg. 45(2): 316-24
- Stephen R. and Thom. 2009. *Oxidative stres is fundamental to hyperbaric oxygen therapy*. Ameican Physicological Society. Hal;106 vol 3.
- Valko, M. 2006. Free Radical, Metal And Antioxidant In Oxidative Stres Induced Cancer. J.Chem-BioI, Rusia, 160: 1-40.
- Wati, I.P.,Aulianni'am, dan C. Mahdi. 2013. *Aktivitas Protease dan Gambaran Histologis Ginjal Tikus Putih (Rattus novergicus) Pasca Induksi Cyclosporine*. A. Kimia Student Journal.1(2) : 258.
- Yuan, D.W., Kim, S.B., Cha, M.S. and Jeong, K.S. 2006. *Kinetics of MMP-1 and MMP-3 produced by mast cells and macrophages in liver fibrogenesis of rat*. Anticancer Research 26(5A): 3517-3526